



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



**„УТИЦАЈ АНТИ-ЦД20  
МОНОКЛОНСКОГ АНТИТЕЛА НА  
КОШТАНЕ БИОХЕМИЈСКЕ МАРКЕРЕ  
И РАНКЛ/ОПГ СИСТЕМ КОД  
НОВОДИЈАГНОСТИКОВАНИХ  
БОЛЕСНИКА СА Б-ЋЕЛИЈСКИМ  
НЕХОЧКИНСКИМ ЛИМФОМИМА”**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор:  
Проф. др Ивана Урошевић

Кандидат:  
Марина Драгичевић Јојкић

Нови Сад, 2023. године

*Posvećeno mojoj najdražoj Iris, suprugu Draženu i mojoj porodici...*

*Hvala na bezuslovnoj ljubavi, strpljenju, podršci i razumevanju...*

*Ogromnu zahvalnost dugujem svom mentoru i svim svojim učiteljima i kolegama na  
savetima, znanju, pomoći i podršci...*

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА<sup>1</sup>

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Марина Драгичевић Јојкић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Ивана Урошевић, редовни професор, Медицински факултет у Новом Саду, Интерна медицина, Хематологија, Клиника за хематологију, Универзитетски клинички центар Војводине
Наслов рада:	„Утицај анти-ЦД20 моноклонског антитела на коштане биохемијске маркере и РАНКЛ/ОПГ систем код новодијагностикованих болесника са Б-ћелијским нехочкинским лимфомима”
Језик публикације (писмо):	Српски језик - латиница
Физички опис рада:	Унети број: Страница: 109 Поглавља: 9 Референци: 248 Табела: 29 Слика: 8 Графикона: 19 Прилога: 2
Научна област:	Медицинске науке
Ужа научна област (научна дисциплина):	Хематологија, Ендокринологија
Кључне речи / предметна одредница:	коштана густина; ремоделовање кости; биомаркери; остеодезитометрија; остеопороза; нехочкински лимфом; моноклонска антитела; нус појаве и нежељене реакције изазване лековима
Резиме на језику рада:	<p><b>УВОД:</b> Нехочкински лимфоми представљају хетерогену групу малигну болести порекла лимфоцита различитог развојног стадијума. Иако је последњих деценија направљен велики напредак у преживљавању болесника са НХЛ-ом, посттерапијске компликације могу у великој мери да наруше квалитет живота ових болесника. Добро је познато да хемиотерапија утиче на губитак коштане густине и развој остеопорозе. Утицај анти-ЦД20 моноклонског антитела, које је постало стандардни део терапијских протокола за лечење Б-ћелијских лимфома, на коштане биохемијске маркере и развој остеопорозе код ових болесника није довољно испитан.</p> <p><b>ЦИЉЕВИ:</b> Утврдити степен промена коштане густине (BMD-g/cm<sup>2</sup>) код болесника са новодијагностикованим Б-ћелијским нехочкинским</p>

<sup>1</sup> Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штампане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штампаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

	<p>лимфомима шест месеци након почетка лечења у односу на коштану густину измерену пре увођења терапије. Утврдити разлику у степену промена коштане густине (BMD-g/cm<sup>2</sup>) шест месеци након почетка примене моноклонског анти-ЦД20 антитела у односу на контролну групу болесника лечених стандардним хемиотерапијским протоколима. Утврдити разлику у степену промена коштаных биохемијских маркера и РАНКЛ/ОПГ система шест месеци након увођења терапије моноклонским анти-ЦД20 антителом у поређењу са контролном групом болесника лечених стандардним хемиотерапијским протоколима.</p> <p><b>МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ:</b> Проспективно истраживање је укључило 60 новодијагностикованих испитаника са Б-ћелијским нехочкинским лимфомима који су подељени у две групе. Испитивану групу чинило је 30 испитаника лечених моноклонским анти-ЦД20 антителом уз полихемиотерапију, док су контролну групу чинили испитаници лечени стандардним хемиотерапијским протоколима без примене моноклонског анти-ЦД20 антитела. Испитаницима су начињене предвиђене лабораторијске анализе и остеодензитометријски прегледи пре и шест месеци након започињања лечења.</p> <p><b>РЕЗУЛТАТИ:</b> Укључено је 60 испитаника, 37 мушкараца и 23 жене. Медијана старости при постављању дијагнозе је била 63,5 (распон: 34-82) година. Укључено је највише испитаника са дифузним Б-крупноћелијским лимфомом (25%), односно фоликуларним лимфомом (25%). Укупно је 66,6% испитаника дијагностиковано у четвртог клиничком стадијуму. Након 6 месеци лечења, код обе групе испитаника, на лумбалној кичми, куку и врату бутне кости, је верификован значајан губитак коштане густине (p = 0,00). Остеопорозу је развило 12 испитаника (20%). Након шест месеци, дошло је до статистички значајног повећања само једног маркера коштане синтезе - П1НП-а, у обе групе испитаника. П1НП је значајно мање растао код контролне групе испитаника (p = 0,01). Већу коштану густину су имали испитаници који су примили 6 циклуса хемиотерапије и који су лечени према Р-ЧХОП протоколу.</p> <p><b>ЗАКЉУЧАК:</b> Наши резултати показују да постоји промењен коштани метаболизам у обе групе испитаника са нехочкинским лимфомима пре и након примењене терапије. Постоји разлика у промени вредности П1НП-а између испитиваних група, односно значајно већи пораст вредности је забележен након лечења у групи испитаника лечених комбинацијом анти-ЦД20 моноклонског антитела уз полихемиотерапију. Неопходно је да се болесници са нехочкинским лимфомима тестирају и прате у односу на коштани метаболизам пре, и у дужем временском периоду након примењене терапије како би се правовременим укључивањем антиресорптивне терапије смањиле негативне последице полихемиотерапије на коштаном ткиву.</p>
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	25.5.2017.
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање,	Председник: Проф др Александар Савић Члан: Проф др Тијана Ичин Члан: Доц. др Дарко Антић

институција)	Члан: Доц. др Боровој Секулић Члан: Доц. др Иванка Перчић
Напомена:	

UNIVERSITY OF NOVI SAD

FACULTY OR CENTER

KEY WORD DOCUMENTATION<sup>2</sup>

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Marina Dragičević Jojkić, MD, teaching assistant
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Professor Ivana Urošević, Faculty of Medicine, University of Novi Sad Clinic for Hematology, Clinical Center of Vojvodina
Thesis title:	"Effect of anti-CD20 monoclonal antibody on bone biochemical markers and RANKL/OPG system in newly diagnosed patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma"
Language of text (script):	Serbian language – latin script
Physical description:	Number of: Pages: 109 Chapters: 9 References: 248 Tables: 29 Illustrations: 8 Graphs: 19 Appendices: 2
Scientific field:	Medicine
Scientific subfield (scientific discipline):	Hematology, Endocrinology
Subject, Key words:	Bone Density; Bone Remodeling; Biomarkers; Absorptiometry, Photon; Osteoporosis; Lymphoma, Non-Hodgkin; Antibodies, Monoclonal; DrugRelated Side Effects and Adverse Reactions
Abstract in English language:	<p><b>INTRODUCTION:</b> Non-Hodgkin lymphomas are a heterogeneous group of malignant diseases which originate from lymphocytes in different stage of development. Despite the improvement achieved in NHL patients survival during the last decades, post-treatment complications can reduce the quality of life in these patients. It is well known that cancer therapy can cause bone mineral density loss and osteoporosis. The impact of monoclonal anti CD20 antibodies, which become a standard of care in B cell lymphomas treatment, on bone biochemical markers and osteoporosis development, is still yet to be defined.</p> <p><b>GOALS:</b> To determine the changes in bone mineral density (BMD-g/cm<sup>2</sup>) in treatment naive B-cell non Hodgkin lymphoma patients before and six months after chemotherapy. To determinate the difference in bone mineral density (BMD-g/cm<sup>2</sup>) six months after starting treatment between the examined and control group. To determinate the difference in bone biochemical markers and RANKL/OPG ratio six months after starting treatment between the examined</p>

<sup>2</sup> The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 – Statement on the authority,

5B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

	<p>and control group.</p> <p><b>MATERIAL AND METHODS:</b> The research was conducted as a prospective study which included 60 patients, divided into two groups: the examined group and the control group. 30 patients were treated with anti-CD20 monoclonal antibody in combination with standard chemotherapy regimens, they represented the examined group, while the control group was treated only with standard chemotherapy regimens. Clinical and laboratory analysis, as well as osteodensitometry were done before and six months after chemotherapy.</p> <p><b>RESULTS:</b> Of the 60 patients, 37 were men and 23 women. The median age at diagnosis was 63.5 (range: 34-82) years. The predominant pathological subtypes were diffuse large B-cell lymphoma (25%) and follicular lymphoma (25%). 66.6% patients were diagnosed in the IV clinical stage. After 6 months of treatment, a significant bone density loss (<math>p=0.00</math>) was verified in both groups of patients, on the lumbar spine, hip and neck of the femur. Osteoporosis developed in 12 patients (20%). After six months, there was a statistically significant increase in only one marker of bone synthesis - P1NP, in both groups of patients. P1NP grew significantly less in the control group of patients (<math>p=0.01</math>). Subjects who received 6 cycles of chemotherapy and who were treated according to the R-CHOP protocol had higher bone density.</p> <p><b>CONCLUSION:</b> Our results show that there is an altered bone metabolism in both groups of patients with non-Hodgkin's lymphoma before and after therapy. There is a difference in P1NP value's changes between the examined groups. A significantly higher increase in P1NP value was recorded after treatment in the group of subjects treated with a combination of anti-CD20 monoclonal antibody and polychemotherapy. It is necessary for patients with non-Hodgkin's lymphomas to be tested and monitored in relation to bone metabolism before and after treatment in order to reduce the negative consequences of polychemotherapy on bone tissue by timely inclusion of antiresorptive therapy.</p>
Accepted on Scientific Board on:	25.5.2017.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	President: Prof. dr Aleksandar Savić Member: Prof. dr Tijana Ičin Member: Asst. Prof. dr Darko Antić Member: Asst. Prof. dr Borivoj Sekulić Member: Asst. Prof. dr Ivanka Perčić
Note:	

## SADRŽAJ

<b>I UVOD</b> .....	1
<b>1. Nehočkinski limfomi (NHL)</b> .....	1
1.1 Epidemiologija NHL-A.....	1
1.2 Etiologija NHL-a .....	2
1.3 Patogeneza NHL-a .....	3
1.4 Klasifikacija NHL-a.....	5
1.5 Klinička prezentacija.....	6
1.6 Dijagnoza i klinički stadijum bolesti.....	7
1.7 Prognozni indeksi.....	7
1.8 Terapija i procena odgovora na terapiju.....	8
1.8.1 Anti-CD20 monoklonsko antitelo - Rituksimab.....	11
<b>2. Koštano tkivo</b> .....	11
2.1 Koštani metabolizam i proces remodelovanja kosti.....	12
2.2 Biohemijski markeri koštanog metabolizma.....	15
2.1.2. RANK, RANKL i OPG.....	17
2.3 Koštani metabolizam u malignim bolestima.....	22
<b>II CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	25
<b>III HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA</b> .....	26
<b>IV MATERIJAL I METODE</b> .....	27
1. MATERIJAL.....	27
1.1 Tip studije.....	27
1.2 Mesto istraživanja.....	27
1.3 Način izbora, veličina i konstrukcija uzorka.....	27
2. METODE.....	28
2.1 Klinička i laboratorijska ispitivanja.....	28
2.2 Metode statističke obrade podataka.....	31
<b>V REZULTATI</b> .....	32
1. Demografski podaci .....	32
2. Kliničke karakteristike osnovne bolesti i ispitani a.....	35



2.1 Dijagnoza osnovne bolesti.....	35
2.2 Klinički stadijum bolesti, prisustvo B simptoma i ekstranodalne lokalizacije.....	36
2.3 ECOG performans status i komorbiditeti ispitanika .....	38
2.4 Prognozni indeksi.....	39
2.4.1 Difuzni B krupnoćelijski limfom .....	39
2.4.2 Folikularni limfom .....	40
2.4.3 Limfom marginalne zone .....	41
2.4.4 Mantle ćelijski limfom.....	42
2.5 Terapija i odgovor na terapiju.....	42
3. Laboratorijski parametri.....	45
3.1 Parametri krvne slike ispitanika i biohemijskih markera aktivnosti bolesti.....	45
3.2 Laboratorijski parametri koštanog metabolizma .....	47
4. Osteodenzitometrijski rezultati.....	51
5. Uticaj kliničkih parametara na postizanje kompletne remisije.....	59
6. Uticaj kliničkih i laboratorijskih parametara na gubitak koštane gustine.....	61
<b>VI DISKUSIJA.....</b>	<b>66</b>
<b>VII ZAKLJUČCI.....</b>	<b>84</b>
<b>VIII LITERATURA.....</b>	<b>85</b>
<b>IX PRILOZI.....</b>	<b>104</b>
Prilog broj 1: Prognozni indeksi.....	104
Prilog br. 2. Referentne vrednosti laboratorijskih parametara.....	109

## LISTA SKRAĆENICA

- NHL - Nehočkinski limfomi
- DBKL - difuzni B-krupnoćelijski limfom
- FL - folikularni limfom
- HIV - virus humane imunodeficijencije
- TMČH - transplantacija matičnih ćelija hematopoeze
- PTLB - postranslantaciona limfoproliferativna bolest (PTLB)
- EBV - Epstein-Barrov virus
- HL - Hočkinov limfom
- NK (engl. *natural killer cells*) - prirodne ćelije ubice
- HCV - hepatitis C virus
- MZL - limfom marginalne zone
- MALT (engl. *mucosa associated lymphoid tissue*) - limfoidno tkivo povezano sa sluznicom
- VDJ - *Variable Diverse Joining*
- BCR - B-ćelijski receptor
- MCL - mantle ćelijski limfom
- MGUS - monoklonska gamapatija neodređenog značaja
- REAL - *Revised European-American Lymphoma*
- WHO - *World Health Organization*
- SZO - Svetska zdravstvena organizacija
- WHO - HAEM5 - *5th edition of the WHO Classification of Haematolymphoid Tumours*
- GIT - gastrointestinalni trakt
- FISH - fluorescentna in situ hibridizacija
- CT - kompjuterizovana tomografija (engl. *computed tomography* – CT)
- FDG PET/CT (engl. *Fluorine-18-Deoxyglucose positron-emission tomography*) - pozitron emisiona tomografija
- IPI (engl. *International Prognostic Index*) - Međunarodni prognozni indeks za difuzni B-krupnoćelijski limfom

- rIPI (engl. *Revised International Prognostic Index*) - Revidirani međunarodni prognozni indeks za difuzni B-krupnoćelijski limfom
- NCCN-IPI - *National Comprehensive Cancer Network International Prognostic Index*
- FLIPI (engl. *Follicular Lymphoma International Prognostic Index*) - Međunarodni prognozni indeks za folikularni limfom
- MALT-IPI (engl. *mucosa-associated lymphoid tissue International Prognostic Index*) - Međunarodni prognozni indeks za limfom marginalne zone
- MIPI (engl. *Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index*) - Međunarodni prognozni indeks mantle ćelijskog limfoma
- CHOP - ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin i prednizon
- mAbs (engl. *monoclonal antibodies*) - monoklonskih antitela
- ICIs (engl. *Immune Checkpoint Inhibitors*) - inhibitori imunog kontrolnog punkta
- mTOR - *Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor*
- HDAC (engl. *histone deacetylase inhibitors*) - inhibitori histon deacetilaze
- CAR T (engl. *chimeric antigen receptor T-cell therapy*) - T-ćelijska terapija himernim antigenskim receptorom
- RECIL - *Response Evaluation Criteria in Lymphoma*
- CR (engl. *complete remission*) - kompletan odgovor
- PR (engl. *partial remission*) - parcijalni odgovor
- MR (engl. *minimal response*) - minimalan odgovor
- SD (engl. *stable disease*) - stabilna bolest
- PD (engl. *progression disease*) - progresija bolesti
- BMU (engl. *basic multicellular unit*) - osnovna multicelularna jedinica
- CXCL12 -. *chemokine (C-X-C motif) ligand 12*
- IL-7 - interleukin 7
- CCL3 - *C chemokine ligand 3*
- MIP-1-alfa (engl. *macrophage inflammatory protein*) - makrofagni upalni protein 1-alfa
- TNF (engl. *tumor necrosis factors*) - faktor nekroze tumora
- GM-CSF (engl. *colony-forming unit for granulocytes and macrophages*) – stimulišući faktor granulocitno-makrofagnih kolonija

- M-CSF (engl. *colony-forming unit for macrophages*) - stimulišući faktor kolonija makrofaga
- HMC - matična ćelija hematopoeze
- RANKL - ligand receptorskog aktivatora nuklearnog faktora (NF) - kB ligand
- RANK (engl. *receptor activator of nuclear factor-κB*) - receptorski aktivator nuklearnog faktora (NF) - kB
- PINC - karboksi-terminalni propeptid kolagena tip I
- PINP -amino-terminalni propeptid kolagena tip I
- TRAP - kisela fosfataza otporna na tartarat
- CTX - C-terminalni telopeptid tipa I kolagena
- NTX I - N-terminalni telopeptid tipa I kolagena
- B-CTx - β-Cross Laps
- ALP - alkalna fosfataza
- BALP (engl. *bone specific alkaline phosphatase*) - koštana specifična alkalna fosfataza
- OPG –osteoprotegerin
- OCIF - inhibitorni faktor osteoklastogeneze
- PGE2 - prostaglandina E2
- PTH - paratiroidni hormon
- IGF-1 - insulinu sličan faktor rasta
- OPGL - steoprotegerin ligand
- ODF - faktor diferencijacije osteoklasta
- PTHrP - *Parathyroid hormone-related protein*
- ADT - terapija deprivacije androgena
- TRACP-5b (engl. *tartrate-resistant acid phosphatase 5b*) - kisela fosfataza otporna na tartrat 5b
- Dkk-1 - *Dickkopf-related protein 1*
- $\bar{x}$  – prosečna vrednost
- SD - standardna devijacija
- Min - najmanja vrednost

# I UVOD

## 1. Nehoćkinski limfomi (NHL)

Nehoćkinski limfomi predstavljaju heterogenu grupu malignih bolesti, razlićitih histoloških i klinićkih karakteristika, koje nastaju iz ćelija limfoidnog sistema, odnosno limfocita razlićitog razvojnog stadijuma. NHL se mogu prezentovati kao indolentne limfoproliferativne bolesti, sa relativno dobro prognozom, i medijanom preživljavanja preko 20 godina, dok sa druge strane mogu biti veoma agresivne prirode, ali sa znaćajnim brojem izlećenih bolesnika primenom intenzivnih hemioterapijskih režima [1, 2].

### 1.1. Epidemiologija NHL-a

NHL su jedni od najućeštalijih tumora širom sveta sa incidencom od preko 540 000 novodijagnostikovanih bolesnika i skoro 260 000 smrtnih slućajeva tokom 2020. godine [3]. Prema aktuelnim literaturnim podacima, incidenca ovih malignih bolesti je u konstantnom porastu poslednjih decenija [4, 5, 6]. Procenjuje se da je u Srbiji tokom 2020. godine dijagnostikovano više od 900 novih slućajeva NHL-a, od kojih je više od polovine preminulo [7]. Najveći broj bolesnika dijagnostikuje se u starijoj životnoj dobi, sa pikom incidence u 75. godini života [8]. Od ovog maligniteta, prema statistićkim podacima više oboleva muška populacija. Kod žena, prema nekim autorima, trudnoća i hormonalni status igraju protektivnu ulogu [6, 9]. Ućeštalost NHL-a takođe pokazuje i geografske varijacije. Veoma često se ovi maligniteti dijagnostikuju u Severnoj Americi, Evropi i Australiji, dok sa druge strane manje ljudi oboleva u Aziji [7]. U svim delovima sveta i meću svim populacijama i dalje je najućeštaliji difuzni B-krupnoćelijski limfom - *DBKL* (engl. *diffuse large B cell lymphoma – DLBCL*) i folikularni limfom - FL, koji zajedno ćine oko 60% svih novodijagnostikovanih B-ćelijskih limfoma [10]. U zavisnosti od geografskog podrućja odnos meću polovima varira od 1,1 do 1,8 u korist muške populacije [10].

## 1.2. Etiologija NHL-a

Znamo li zašto nastaju NHL? Etiologija ovih maligniteta nije dovoljno razjašnjena i u većini slučajeva ostaje nepoznata [11]. Pojedine epidemiološke varijacije sugeriraju, da pored genetike, u nastanku NHL-a potencijalnu ulogu imaju imunološke bolesti, infektivni agensi, faktori životne sredine i životnog stila (pušenje, konzumacija alkohola i gojaznost). Tokom poslednje dve decenije brojne epidemiološke studije pružile su nove informacije o mogućim uzrocima limfoma. Većina studija podržava ideju da postoji značajna etiološka heterogenost uglavnom zbog poznate različitosti unutar ove grupe maligniteta [12].

NHL su direktno povezani sa imunološkim sistemom domaćina, zato je, do sada, imunosupresija najpoznatiji faktor rizika za razvoj NHL-a [11, 13, 14]. U poređenju sa opštom populacijom, postoji povećan rizik od razvoja NHL-a kod pozitivnih osoba na virus humane imunodeficijencije (HIV), dok su bolesnici podvrgnuti transplantaciji matičnih ćelija hematopoeze (TMČH) ili transplantaciji solidnih organa u većem riziku za nastanak postranslantacione limfoproliferativne bolesti (PTLB) [15, 16].

Neki virusi mogu direktno transformisati limfocite. Jedan od takvih je prvi detektovan humani onkogeni virus – *Epstein-Barr-ov virus* (EBV), koji je etiološki povezan ne samo sa *Burkitt-ovim*, Hočkinovim limfomom (HL), PTLB-om i sinonazalnim limfomima, već i sa širokim spektrom limfoproliferativnih bolesti B, T i NK (engl. *natural killer cells* – prirodne ćelije ubice) ćelijskog porekla [17, 18]. Virus humane imunodeficijencije jedinstven je po tome što izaziva NHL indukujući duboku depleciju CD4<sup>+</sup> T-limfocita i dovodi do stečene imunodeficijencije i nekontrolisane proliferacije B-limfocita [19]. Prema dosadašnjim saznanjima hepatitis C virus (HCV) hroničnom stimulacijom imunološkog sistema indukuje limfomagenezu [20]. Najčešći NHL podtipovi povezani sa HCV infekcijom su limfom marginalne zone (MZL), naročito splenični i difuzni B-krupnoćelijski limfom [21].

Pored virusa, bakterijske infekcije su značajni etiološki faktori u razvoju limfoma, i to najčešće ekстранodalnih limfoma marginalne zone (MZL) [22]. Najčešći ekстранodalni MZL, MALT limfom želuca (engl. *mucosa associated lymphoid tissue*) je strogo povezan sa *Helicobacter pylori* infekcijom i eradikaciona terapija predstavlja prvu terapijsku liniju za navedeni limfom [22].

Brojna zanimanja su povezana sa povećanim rizikom za razvoj NHL-a, uključujući stočare, zemljoradnike, profesije koje dolaze u kontakt sa hemijskim toksičnim materijama, posebno benzenom, radnici u industriji guma, radnici u rafinerijama, vatrogasci i slikari [23].

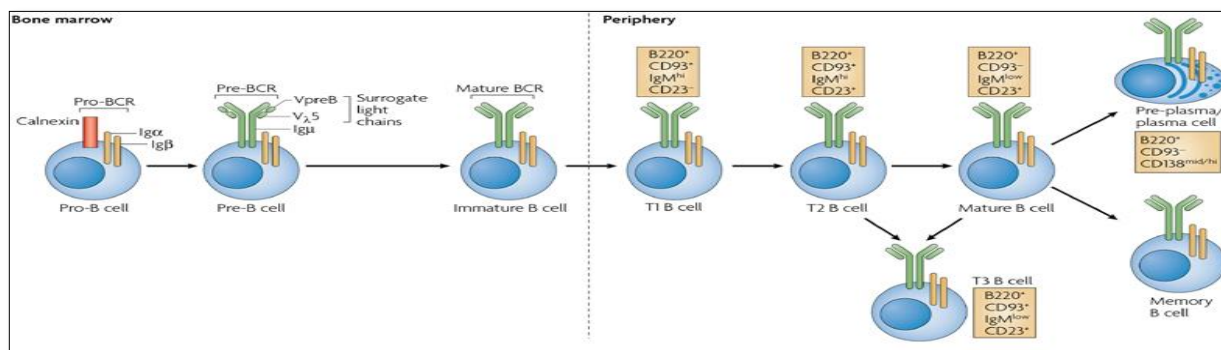
Dosadašnja istraživanja potvrdila su povezanost životnog stila i NHL-a. Zna se da su

gojaznost, visok kalorijski unos, veća potrošnja ugljenih hidrata i proteina povezani sa povećanim rizikom od NHL-a [24, 25].

### 1.3. Patogeneza NHL-a

Tokom poslednje dve decenije, otkrivanjem novih onkogenih mehanizama limfomogeneze, napravljen je veliki napredak u razumevanju kompleksne patogeneze NHL-a [26, 27]. NHL nastaju malignom transformacijom i klonskom proliferacijom B, T, NK ćelija ili prekursora ovih ćelija. Faza diferencijacije limfocita u kojoj se odigrava onkogeni događaj određuje fenotip, prezentaciju, a delom i tok i ishod bolesti [26].

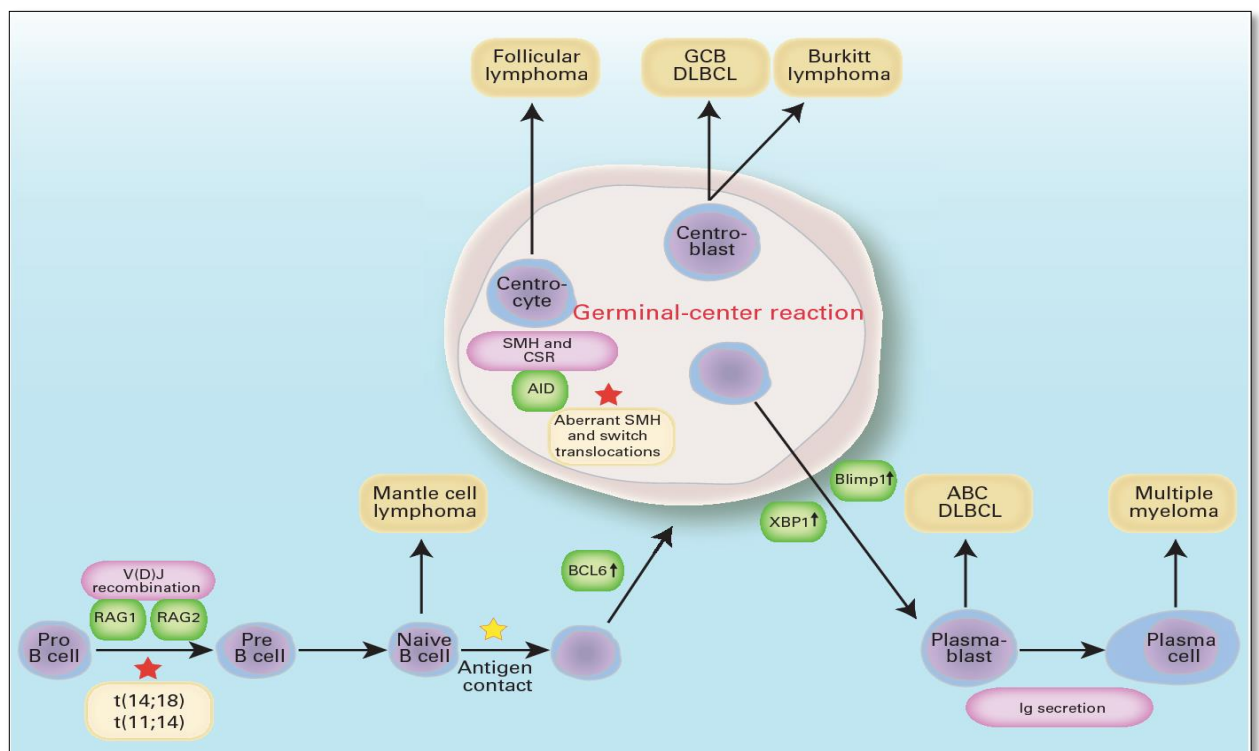
NHL su prekla B-limfocita u 80% - 95% slučajeva i nastaju diferencijacijom matičnih ćelija hematopoeze u koštanoj srži. Većina razvojnih stadijuma B-limfocita odvija se u ovom primarnom limfoidnom organu, a nastavlja se, do konačnog sazrevanja i preobražaja u imunokompetentne ćelije, u slezini i drugim sekundarnim limfnim organima [28]. Razvoj B-limfocita prolazi kroz različite stadijume, koji se razlikuju prema veličini ćelija, njihovoj mitotskoj aktivnosti, ekspresiji površinskih ćelijskih markera i genetskim rearanžmanima lokusa teškog i lakog lanca imunoglobulina (Ig) [29].



**Slika 1.** Razvoj B-ćelije: od matične ćelije hematopoeze do zrele B-ćelije [30] (sa dozvolom izdavača)

Diferencijacija B-ćelija počinje u koštanoj srži od prekursora ćelija, odnosno od progenitornih B-ćelija. Tokom antigen-nezavisne faze razvoja B-limfocita, koja se dešava u primarno limfnim organima, dolazi do rekombinacije genskih segmenata za varijabilne regije teških i lakih lanaca antitela u B-ćelijskim linijama, u procesu poznatom kao rekombinacija V(D)J (engl. *Variable Diverse Joining*) [30, 31]. Navedeni proces rezultuje formiranjem i eksprimiranjem B-ćelijskog receptora (BCR), čija je stimulacija odgovorna za sazrevanje B-

ćelije, njen opstanak i sudbinu [32, 33, 34]. Proces VDJ rekombinacije prvo je mesto gde može doći do nastanka greške u diferencijaciji B-ćelije, najčešće translokacija, što dovodi do prekomerne ekspresije proto-onkogeno i nekontrolisane proliferacije limfocita [34]. Migriranjem u periferna limfoidna tkiva B-limfociti postaju zrele, imunološki naivne ćelije, koje na svojoj površini ekspimiraju imunoglobulin M i imunoglobulin D (IgM+, IgD+). Ukoliko dođe do zastoja u diferencijaciji B-ćelija u ranim stadijumima zrelosti (na nivou prekursorskih ćelija) nastaju prekursori B-limfoblastni limfomi, odnosno akutne B-limfoblastne leukemije [35]. Iz naivnih, pred-germinalnih CD5+ B-limfocita zone plašta limfnih folikula (engl. *mantl zone*) nastaje većina mantle ćelijskih limfoma (MCL), uz dodatne anomalije hromozoma i pojačanu ekspresiju ciklina D1 (engl. *Cyclin D1*), što rezultuje poremećajem ćelijskog ciklusa i agresivnom limfomagenezom [35]. U perifernim limfoidnim tkivima dešava se antigen-zavisna faza razvoja B-limfocita, u kojoj se B-limfociti, sa ili bez pomoći T-limfocita, diferenciraju u plazma ćelije - plazmocyte, koji stvaraju antitela [36]. Bolesti koje karakteriše plazma ćelijska proliferacija su monoklonska gamopatija neodređenog značaja (MGUS), plazmocitom, multipli mijelom, bolest odlaganja monoklonskih imunoglobulina i bolest teških lanaca [37, 38].



**Slika 2.** Patogeneza B ćelijskih NHL-a [39] (sa dozvolom izdavača)



Brojne kompleksne genetske abnormalnosti koje utiču na protoonkogene i tumor-supresor gene igraju ulogu u patogenezi limfoma. Potvrđeno je da su hromozomske abnormalnosti u NHL-u povezane sa histološkim podtipom, imunofenotipom, stepenom agresivnosti tumora, odgovorom na terapiju i prognozom. Translokacija t(14;18) je najčešća hromozomska abnormalnost kod NHL-a i najčešće se sreće prilikom dijagnostikovanja folikularnog limfoma. Translokacija t(11;14) koja je povezana sa mantle ćelijskim limfomom, dovodi do prekomerne ekspresije ciklina D1. Detekcija translokacija t(8;14), c-MYC (8) i teškog lanca Ig (14) su neophodne prilikom dijagnostikovanja *Burkitt*-ovog limfoma. Kod DBKL-a najčešće se nalaze BCL-2, BCL-6, MYC translokacije [40,41].

#### 1.4. Klasifikacija NHLa

Još od momenta prvih opisa non-Hodgkin limfoma ulagani su veliki naponi da se navedena grupa bolesti klasifikuje. Inicijalne klasifikacije NHL-a *Rappaportova*, *Kielska* i *Lukes-Collinsova* bile su bazirane na patohistološkoj građi tkiva, izgledu i imunološkim karakteristikama malignih ćelija [42]. Razvojem novih tehnologija u okviru dijagnostike limfoma, i potrebe da se postigne konsenzus između patologa i kliničara, 1994. došlo je do razvoja REAL (engl. *Revised European-American Lymphoma*) klasifikacije koja uključuje morfologiju, imunofenotipske karakteristike, citogenetske promene i kliničke osobine limfoma [43]. Nova WHO (engl. *World Health Organization*) klasifikacija, odnosno klasifikacija Svetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2001. godine je inkorporirala i neke nove aspekte etiopatogeneze, te je postala internacionalni standard u svakodnevnoj kliničko/naučnoj praksi [44]. Aktuelno je u upotrebi Klasifikacija hematoloških tumora Svetske zdravstvene organizacije (engl. *5th edition of the WHO Classification of Haematolymphoid Tumours – WHO-HAEM5*) iz 2022. godine. U novoj revidiranoj klasifikaciji napravljena je reorganizacija entiteta prema hijerarhiji, modifikacija nomenklature pojedinih entiteta, revizija dijagnostičkih kriterijuma za neke podtipove, brisanje i uvođenje novih entiteta, kao i uključivanje lezija sličnih tumoru (engl. *tumor-like lesion*), mezenhimalnih lezija specifičnih za limfni čvor i slezinu, i sindromi predispozicije zametne linije (engl. *germline*) povezani sa limfoidnim neoplazmama [45].

Bez obzira na napredak koji je postignut najnovijom revizijom WHO klasifikacije, ovo očigledno nije poslednja reč nauke i struke. Nova saznanja iz svih oblasti limfoma su u ekspanziji te je za očekivati da će doći do detekcije novih, klinički značajnih podgrupa

limfoma koje ranije nisu bile poznate.

### 1.5. Klinička prezentacija

Klinička slika NHL-a može biti veoma šarolika i razlikuje se u zavisnosti od tipa limfoma i zahvaćenih područja [1]. U odnosu na klinički tok kojim bolest napreduje postoji gruba podjela limfoma na agresivne i indolentne limfome.

- Agresivni NHL su akutne ili subakutne bolesti, imaju dramatičniju kliničku sliku, agresivniji tok i rapidnu progresiju. Čine oko 60% svih slučajeva NHL-a [10]. Lečenje kod ovakvih limfoma treba započeti odmah s ciljem postizanja kompletne remisije uzimajući u obzir da su ovo potencijalno izlečive bolesti, a ako se prvom terapijskom linijom ne postigne kompletna remisija verovatnoća postizanja kompletne remisije sledećim linijama lečenja je značajno manja. U slučaju da se ovakvi limfomi ne leče, brzo se završavaju smrtnim ishodom. DLBCL je najčešće dijagnostikovani predstavnik ove grupe limfoma.
- Indolentni su sporo progredirajuće bolesti i najčešće se inicijalno prezentuju blagom kliničkom slikom. Godinama mogu da postoje u vidu diskretne limfadenopatije, hepatomegalije, splenomegalije i/ili citopenije. Terapijskim opcijama kojima aktuelno raspoložemo indolentne limfome ne možemo izlečiti. Ukoliko nema simptoma i velike tumorske mase, ovakvi limfomi ne zahtevaju primenu terapije. Indolentni limfomi predstavljaju oko 40% svih slučajeva NHL-a [10]. Folikularni limfom je najčešći predstavnik ove grupe limfoma [46].

Najčešći, prvi znak bolesti, koji se dijagnostikuje kod polovine bolesnika, je bezbolno uvećanje jednog ili više perifernih limfnih čvorova, obično u vratu, pazuhu ili preponama. Limfomi, kod pojedinih bolesnika izazivaju sistemske, odnosno opšte simptome, poznate i kao *B* simptome, koji su posledica oslobađanja citokina iz tumorskih ćelija i/ili ćelija imunološkog sistema koje stupaju u reakciju sa tumorom. Pod *B* simptomima podrazumevamo:

- povišenu telesnu temperaturu ( $>38^{\circ}\text{C}$ ), tokom tri uzastopna dana, koja se uglavnom javlja tokom popodnevnih i večernjih časova, spontano pada i može imati različitu dužinu trajanja,
- pojačano noćno znojenje, pogotovo noću,

- neobjašnjiv gubitak telesne težine (>10% normalne telesne težine) u periodu od šest meseci ili kraće [47, 48].

Ekstranodalna manifestacija bolesti kod NHL-a nije retka pojava i prisutna je u 40% slučajeva [49]. DBKL je najčešće dijagnostikovani tip limfoma sa ekstranodalnom manifestacijom bolesti, a želudac, odnosno gastrointestinalni trakt (GIT), najčešća lokalizacija ekstranodalnog NHL-a (30–40% svih ekstranodalnih limfoma) [50, 51].

## 1.6. Dijagnoza i klinički stadijum bolesti

Zlatni standard za postavljanje dijagnoze bolesti je biopsija uvećanog limfnog čvora ili drugog zahvaćenog tkiva. Reprezentativan uzorak, koji podleže patohistološkom pregledu, najčešće se dobija ektirpacijom uvećanog limfnog čvora, dok postavljanje dijagnoze bolesti aspiracijom tankom iglom (engl. *fine-needle*) se ne preporučuje [1]. Dijagnoza može zahtevati sprovođenje i dodatnih citogenetskih i molekularnih analiza hromozomskih aberacija fluorescentnom in situ hibridizacijom (FISH) [52].

Nakon postavljanja konačne dijagnoze neophodno je načiniti procenu raširenosti bolesti. Biopsija koštane srži smatra se ključnom za inicijalnu procenu, pri čemu prisustvo limfomskih ćelija u koštanoj srži automatski bolesnika klasifikuje u grupu uznapredovalog kliničkog stadijuma bolesti [53]. U proceni stadijuma bolesti najčešće se koristi kompjuterizovana tomografija (engl. *computed tomography* – CT), iako se pozitronska emisiona tomografija (engl. *Fluorine-18-Deoxyglucose positron-emission tomography* – FDG PET/CT) polako nameće kao standard u određivanju raširenosti bolesti na prezentaciji [54]. Od 1971. godine u kliničkoj upotrebi je *Ann Arbor staging* sistem koji NHL klasifikuje u četiri stadijuma, pri čemu III i IV klinički stadijum predstavljaju uznapredovalu bolest [55].

Ukoliko postoji *Bulky* bolest koja podrazumeva medijastinalnu masu koja je veća od 1/3 unutrašnjeg poprečnog torakalnog prečnika grudnog koša merena na nivou Th5 ili Th6, ili je tumorska masa veća od 10 cm (za difuzni B-krupnoćelijski limfom) odnosno 6cm u slučaju folikularnog HNL, u bilo kom prečniku, klinički stadijum se označava sa X [55, 56].

## 1.7. Prognozni indeksi

Pored kliničkog stadijuma bolesti, za najčešće tipove nehoćkinskih limfoma razvijeni su prognozni indeksi koji prepoznaju bolesnike koji imaju veći rizik za lošiji ishod. Prvi takav skor bio je međunarodni prognozni indeks, IPI indeks (engl. *International Prognostic Index*)

razvijen 1993. godine sa ciljem da predvidi terapijski ishod bolesnika sa agresivnim NHL-om [57]. Pored IPI, modifikovanog rIPI i NCCN-IPI indeksa, postoje i drugi prognozni indeksi za druge vrste limfoma, za folikularni limfom – FLIPI, FLIPI-2 i PRIMA-PI indeks, za limfom marginalne zone – MALT-IPI indeks, za mantle ćelijski limfom – MIPI i MIPI-c i za *Waldenstromovu* makroglobulinemiju ISSWM indeks, kao i mnogi drugi [58-65].

### **1.8. Terapija i procena odgovora na terapiju**

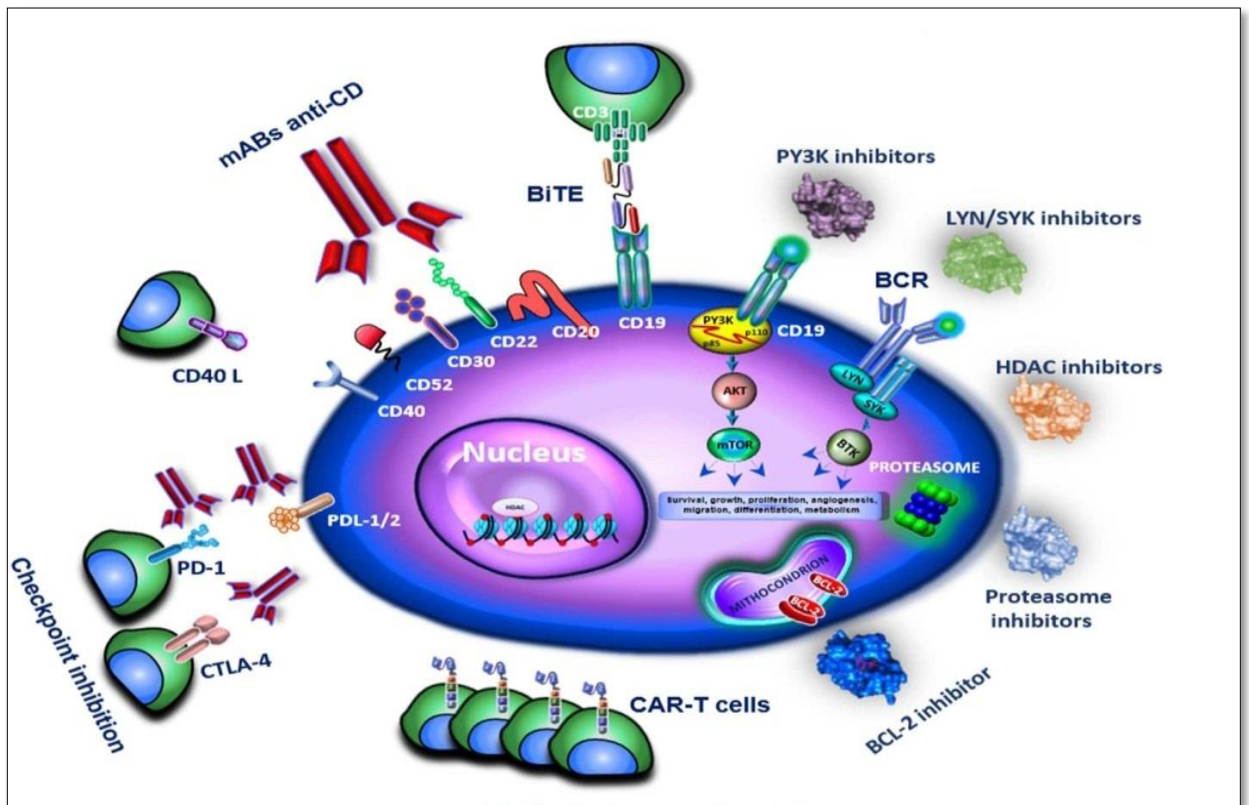
Lečenje NHL-a je složen proces koji prvenstveno zavisi od: patohistološkog tipa limfoma, imunofenotipa, kliničkog stadijuma, prisustva opštih simptoma, starosti bolesnika i prisutnih komorbiditeta [47, 66]. U lečenju limfoma najčešće se primenjuju hemioterapija, imunoterapija, radioterapija, transplantacija matičnih ćelija hematopoeze u kombinaciji sa polihemioterapijom, a u pojedinim slučajevima postoji potreba i za hirurškim tretmanima. Hemioterapija je glavni tretman za većinu bolesnika sa NHL-om. U zavisnosti od tipa i kliničkog stadijuma limfoma, hemioterapija se može koristiti samostalno ili u kombinaciji sa drugim tretmanima, kao što je imunoterapija i/ili radioterapija. Jedna od najčešćih hemioterapijskih kombinacija koja se koristi za lečenje bolesnika sa NHL-om je CHOP protokol, koji uključuje ciklofosfamid, doksorubicin, vinkristin u kombinaciji sa kortikosteroidnom terapijom. Hemioterapija se često kombinuje sa imunoterapijskim lekom, najčešće, monoklonskim anti-CD20 antitelom (rituksimab) [63]. Rituksimab je promenio pravac lečenja i ishode za sve CD20+ NHL-e i predstavlja verovatno najveći napredak u lečenju limfoma poslednjih decenija. Kod pacijenata sa NHL-om, dodavanje rituksimaba standardnom tretmanu značajno je poboljšalo odgovor na terapiju i ukupno preživljavanje [67-69]. Radioterapija zauzima značajno mesto u lečenju NHL-a, pogotovo što predstavlja najmoćniju monoterapijsku opciju kako za indolentne, tako i za agresivne podtipove. Koristi se kao glavni tretman za početne, lokalizovane kliničke stadijume bolesti, a kod uznapredovale bolesti može se kombinovati sa polihemioterapijom [70]. Još uvek postoji značajan broj bolesnika kod kojih su gore navedeni terapijski režimi neefikasni. Iz tog razloga postoji konstantna potreba za otkrićem novih ciljanih terapija. U poslednjoj deceniji došlo je do izuzetnog i eksponencijalnog razumevanja intracelularnih procesa koji su poremećeni tokom limfomogeneze što je rezultiralo pronalaskom i razvojem novih ciljanih terapijskih agenasa:

- monoklonskih antitela (engl. *mAbs* - obinutuzumab, alemtuzumab, brentuksimab

vedotin, polatuzumab vedotin i dr.)

- inhibitora imunog kontrolnog punkta (engl. *Immune Checkpoint Inhibitors (ICIs)* - atezolizumab, nivolumab i drugi),
- bispecifičnih antitela (blinatumomab i drugi),
- inhibitora puteva transdukcije signala:
  - ✓ BCR inhibitora (inhibitori Brutonove tirozin kinase, npr. ibrutinib, PI3K inhibitori-idelalisib i dr.)
  - ✓ inhibitora proteazoma (bortezomib, carfilzomib i dr.)
  - ✓ mTOR inhibitora (engl. *Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor* – everolimus i dr.)
  - ✓ BCL2 inhibitora (venetoklaks),
  - ✓ HDAC Inhibitora (inhibitori histon deacetilaze - panobinostat) [71].

Takođe, zahvaljujući razvoju CAR T-ćelijske terapije (engl. *chimeric antigen receptor T-cell therapy*), personalizovanog tretmana koji uključuje upotrebu genetski modifikovanih T-limfocita, poboljšano je preživljavanje bolesnika sa visoko refraktornim NHL [72].



**Slika 3:** Različite “target” terapije u lečenju B-NHL-a [72]

Evucija savremenih, netransplantacionih strategija doprinela je superiornim

ishodima u lečenju bolesnika sa NHL-om u poslednje dve decenije. Danas, sa inovativnim lečenjem bolesnika sa NHL-om, ukupno preživljavanje, nakon pet godina, iznosi preko 73%, a većina recidiva bolesti se javlja u prve dve godine nakon terapije. Do 40% bolesnika sa agresivnim i indolentnim limfomima uznapredovalog kliničkog stadijuma je ili refraktorno na terapiju ili ima relaps nakon inicijalnog lečenja. Autologna transplantacija matičnih ćelija hematopoeze u kombinaciji sa polihemioterapijom je standardni tretman za relaps/refraktorni NHL visokog stepena agresivnosti [73, 74]. Kod asimptomatskih bolesnika sa indolentnim oblicima NHL-a, može se primenjivati strategija, sačekaj i vidi (engl. *watch and wait*), odnosno lečenje se može odložiti dok bolesnik ne postane simptomatičan. Pojedini tipovi limfoma se mogu lečiti i primenom antibiotske terapije, u slučaju pomenutog MALT limfoma povezanog sa *Helicobacter pilori* infekcijom, odnosno operativnog zahvata koji je rezervisan za lokalizovani limfom želuca [75].

2017. godine definisan je novi kriterijum za evaluaciju odgovora na terapiju kod bolesnika sa NHL-om – RECIL 2017 (engl. *Response Evaluation Criteria in Lymphoma*), koji je predložen kao alternativa, odnosno zamena za Lugano klasifikaciju. *Deauville* skor, takođe, je sastavni deo RECIL-a, kod koga je, u odnosu na Lugano klasifikaciju iz 2014. godine, stavljen veći naglasak na morfološki odgovor bolesnika potvrđenog kompjuterizovanom tomografijom i dodata nova kategorija odgovora – minimalan odgovor [76, 77].

**Tabela 1.** Kriterijumi odgovora na terapiju (RECIL 2017)

	CR	PR	MR	SD	PD
<b>% promene u odnosu na inicijalni nalaz</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Potpuni nestanak svih lezija i dimenzije svih limfnih čvorova &lt;10mm.</li> <li>• <math>\geq 30\%</math> smanjenje zbira najdužih prečnika ciljnih lezija (PR) sa normalizacijom FDG-PET nalaza</li> </ul>	$\geq 30\%$ smanjenje zbira najdužih prečnika ciljnih lezija ali ne zadovoljava kriterijume za CR	$\geq 10\%$ smanjenje zbira najdužih prečnika ciljnih lezija ali ne zadovoljava kriterijume za PR	<10% smanjenje zbira ili $\leq 20\%$ povećanje zbira najdužih prečnika ciljnih lezija	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>&gt;20\%</math> povećanje zbira najdužih prečnika ciljnih lezija</li> <li>• Za male limfne čvorove veličine &lt;15 mm nakon terapije, minimalno apsolutno povećanje od 5 mm i duži prečnik treba da pređe 15 mm</li> <li>• Pojava novih lezija</li> </ul>
<b>FDG-PET</b>	Normalizacija FDG-PET (Deauville skor 1-3)	Pozitivan (Deauville skor 4-5)	Bilo koji nalaz	Bilo koji nalaz	Bilo koji nalaz
<b>Infiltracija koštane srži</b>	/	Bilo koji nalaz	Bilo koji nalaz	Bilo koji nalaz	Bilo koji nalaz
<b>Pojava novih</b>	Ne	ne	Ne	ne	da/ne

<b>promena</b>					
----------------	--	--	--	--	--

CR – kompletan odgovor; FDG-PET - [18F] 2-fluoro-2-deoksi-D-glukoza, PR – parcijalni odgovor, MR – minimalan odgovor, SD – stabilna bolest, PD – progresija bolesti.

### **1.8.1. Anti-CD20 monoklonsko antitelo - rituksimab**

Rituksimab predstavlja himerno anti-CD20 monoklonsko antitelo, koje se koristi u lečenju limfoproliferativnih i autoimunih bolesti. Rituksimab je bio prvo terapijsko antitelo odobreno od strane Američke administracije za hranu i lekove 1997. godine za terapiju onkoloških bolesnika. Od svog inicijalnog uvođenja u kliničku praksu, rituksimab je napravio revoluciju u lečenju svih B-ćelijskih maligniteta, drastično poboljšavajući rezultate lečenja. Rituksimab se sastoji od konstantnog humanog regiona IgG1 imunoglobulina i varijabilnog regiona iz anti-CD20 mišjeg antitela. Ovaj lek ima dejstvo direktno na tumorske ćelije koje na površini imaju CD20 antigen. CD20 je površinski transmembranski proteinski marker ekspimiran na B ćelijama tokom diferencijacije od pre-B ćelije do stadijuma plazma ćelije. Veruje se da CD20 funkcioniše kao kalcijumski kanal i igra ulogu u sazrevanju i aktivaciji B-ćelija. Jednom kada se rituksimab veže za CD20 pozitivne ćelije, ćelijska smrt se indukuje različitim mehanizmima, uključujući ćelijski posredovanu citotoksičnost, citotoksičnost posredovanu komplementom, fagocitozu zavisnu od antitela i direktne toksične efekte vezivanja leka na CD20 antigen [78, 79].

Iako je tema uticaja anti-CD20 antitela na koštanu gustinu veoma aktuelna uglavnom je ispitivana u populaciji bolesnika sa reumatoidnim artritisom, dok sa druge strane, postoji tek nekolicina studija koje su se bavile efektom rituksimaba na koštani metabolizam u hematološkim malignitetima, posebno u NHL-u [80-85]. Dok neke studije pokazuju pozitivan efekat rituksimaba na koštani metabolizam [80, 83], druge prezentuju rezultate koje govore u prilog smanjenja koštane gustine i povećanje markera resorpcije kosti [81, 82, 84, 85].

## **2. Koštano tkivo**

Koštano tkivo je ekstremno specijalizovano vezivno tkivo, metabolički veoma aktivno, koje zajedno sa hrskavicom čini snažan i čvrst endoskelet [86]. Jedna od jedinstvenijih i najvažnijih osobina kosti je njena sposobnost da se stalno podvrgava procesu remodelovanja koje se dešava čak i nakon završetka rasta. Procesi remodelovanja omogućavaju kosti da se menja i adaptira na mehaničke, metaboličke, nutritivne i neuroendokrine promene. Koštano tkivo zajedno sa hrskavicom obavlja tri glavne funkcije:

mehaničku – služeći za pripoj mišića, zaštitnu – štiteći vitalne organe, i metaboličku – s obzirom na to da predstavlja rezervoar za kalcijum, magnezijum, fosfor, natrijum i druge jone koji su neophodni za esencijalne funkcije organizma. Takođe, kosti su mesto gde se odvija i reguliše hematopoeza, s obzirom na to da ovo tkivo obezbeđuje niše za proliferaciju i diferencijaciju hematopoetskih ćelija [87-89]. Pojedine studije sugerišu da koštano tkivo može imati i dodatne važne endokrine uloge u reprodukciji, metabolizmu glukoze, regulaciji apetita i mišićnoj funkciji [90]. Koštano tkivo je izgrađeno od različitih tipova ćelija kao što su: osteoblasti, osteoklasti, osteociti, hondrociti, stromalne ćelije i adipociti. Ekstracelularna komponenta kosti je izgrađena od čvrste mineralne materije, odnosno organskog matriksa sastavljenog u najvećoj meri od kolagena tipa I (90% - 95%), dok nekolageni deo organskog matriksa sadrži serumske proteine, kao što je albumin i mnoge druge lokalno sintetisane proteine, čije funkcije još nisu dovoljno poznate [91].

## 2.1 Koštani metabolizam i proces remodelovanja kosti

Uprkos svojoj naizgled statičnoj strukturi, koštano tkivo je veoma dinamično i podleže stalnom remodelovanju, koje predstavlja složen kontinuirani proces zamene stare kosti novim tkivom. Koštano remodelovanje ima dve osnovne funkcije: reparaciju mikrooštećenja skeleta da bi se održala njegova jačina i osigurala relativna mladost, kao i održavanje mineralne homeostaze oslobađanjem zaliha jona kalcijuma i fosfora [88, 89]. Celokupni proces remodelovanja koštanog tkiva je strogo kontrolisan i koordinisan proces, regulisan brojnim biohemijskim i mehaničkim faktorima, kako lokalnim, tako i sistemskim. Održavanje fiziološkog koštanog remodelovanja i sistemske mineralne homeostaze zahteva ravnotežu između procesa formiranja i resorpcije kosti, a održavanje ove ravnoteže se zasniva na direktnoj komunikaciji između različitih tipova koštanih ćelija. Ćelije osteoblastne linije (osteoblasti, osteociti i *lining* ćelije, odnosno ćelije koje oblažu kost) i resorptivne ćelije kosti (osteoklasti), zajedno sa svojim ćelijama prekursorima, organizovane su u specijalizovane jedinice koje se nazivaju osnovne multicelularne jedinice (engl. BMU – *basic multicellular unit*) koštanog remodelovanja. Brzina remodelovanja kao i količina resorbovane i formirane kosti zavisi od broja aktiviranih BMU [91-93].

**Osteoblasti** su ćelije koje vode poreklo od nediferentovanih matičnih mezenhimnih ćelija, a čija je osnovna funkcija sinteza i sekrecija organskog matriksa, kao i regulacija njegove mineralizacije. Oni proizvode proteine koštanog matriksa: kolagen tipa I, osteokalcin,



koštani sijaloprotein i osteopontin. Aktivni osteoblasti se nalaze na površini novoformirane kosti i nakon sekrecije matriksa koji zatim postaje mineralizovan, osteoblast postaje osteocit. Jedna od još nedovoljno istraženih funkcija osteoblasta je njegov uticaj na hematopoezu, tačnije diferencijaciju B-limfocita. Veruje se da su primarni osteoblasti specijalizovane ćelije koje funkcionišu kao osteoblastna niša, koja pospešuje *in vitro* B-limfopoezu. Unutar koštane srži pronađena je populacija ćelija strome koja luči citokine, CXCL12 (engl. *chemokine (C-X-C motif) ligand 12*) i interleukin 7 (IL-7), koji imaju bitnu ulogu u procesu sazrevanja, preživljavanja i aktivacije B-limfocita. Oba citokina su izražena u ćelijama osteoblastne loze što sugeriše da bi osteoblasti mogli biti uključeni u usmeravanje diferencijacije hematopoetskih matičnih ćelija prema B-limfocitima [87, 94, 95]. Sa druge strane, uticaj B-limfocita na osteoblaste je manje istražen, iako postoje indicije da B-limfociti mogu inhibirati diferencijaciju osteoblasta putem signala hemokinskog (C-C motivni) liganda 3 (engl. *C chemokine ligand 3 - CCL3*), poznatog i kao makrofagni upalni protein 1-alfa (MIP-1-alfa), kao i preko TNF signalizacije, odnosno faktora nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factors*) [96].

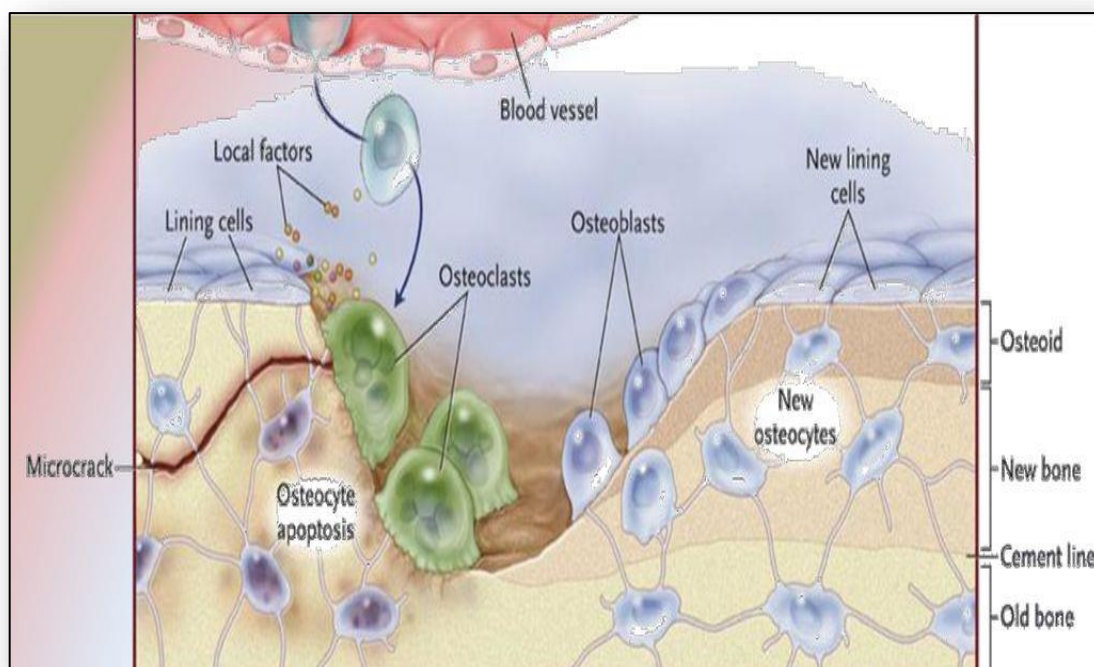
Resorpcija kosti se odvija uglavnom delovanjem **osteoklasta**, velikih višejedarnih ćelija koje nastaju iz hematopoetske progenitorne ćelije mononukleusne-fagocitne loze, odnosno zajedničkog prekursora makrofaga i osteoklasta. Hematopoetska matična ćelija pod uticajem stimulišućeg faktora granulocitno-makrofagnih kolonija (engl. *colony-forming unit for granulocytes and macrophages - GM-CSF*) i stimulišućeg faktora kolonija makrofaga (engl. *colony-forming unit for macrophages - M-CSF*) može se diferencirati u monocit-makrofag ili u proosteoklast [87, 97]. Kao i drugi potomci hematopoetske matične ćelije, prekursori osteoklasta se kao cirkulišuće ćelije mogu detektovati u krvi. Njihov broj je značajno povećan u inflamaciji, koju karakteriše visok nivo snažnog inflamatornog citokina – faktora nekroze tumora (TNF). Pokazalo se da osteoklasti regulišu nišu hematopoetske matične ćelije (HMĆ) na dva načina: direktno, povećavajući mobilizaciju i oslobađanje MĆH u cirkulaciju sekrecijom katepsina K, ključnog proteina odgovornog za funkciju osteoklasta, i indirektno, utičući na manju diferencijaciju mezenhimalnih matičnih ćelija u osteoblaste, što posledično dovodi do poremećaja održavanja MĆH u koštanoj srži. Zbog navedenih relacija ćelija kosti i MĆH, broj i aktivnost osteoklasta moraju biti strogo regulisani i kontrolisani, jer svaka promena može dovesti do prekomerne mobilizacije MĆH [98].

**Osteociti** su najzastupljeniji tip ćelija u zreloj kosti, zauzimaju čak 95% ukupnog broja ćelija. Jedne su od najdugovečnijih ćelija u ljudskom organizmu (prosečan poluživot

osteocita iznosi 25 godina). Predstavljaju glavne regulatore metabolizma kosti [89, 99]. Osteociti prožimaju mineralizovani koštani matriks formirajući međusobno gustu mrežu, zahvaljujući kojoj obavljaju jedan vid mehanotransdukcije, odnosno prenosa mehaničkih sila u vidu biohemijskih signala obližnjim osteocitima. Osteociti deluju kao provodnici za ove signale i upućuju okolne ćelije kako da se prilagode i kompenzuju mehanički stress [100, 101]. Što se tiče relacija osteocita i ćelija imunološkog sistema, Sato je dokazao da *in vivo* ablacija osteocita dovodi do teške limfopenije, uzrokovane gubitkom strome limfoidnog tkiva timusa i koštane srži, koja se regeneriše ponovnim uspostavljanjem normalnog broja osteocita [102].

Sam proces remodelovanja kosti prolazi kroz šest uzastopnih faza: faze mirovanja, aktivacije, resorpcije, faze preokreta (engl. *reversal phase*), faze formiranja i završetka. Ciklus počinje apoptozom osteocita što je najverovatnije prvi signal za započinjanje procesa koštanog remodelovanja. Apoptoza osteocita dovodi do oslobađanja parakrinih faktora koji povećavaju lokalnu angiogenezu i nakon detekcije inicirajućih signala regrutuju monocit-makrofagnog prekursora osteoklasta iz cirkulacije. Mikrooštećenja ili mehaničke sile koje dovode do apoptoze osteocita pokreću sam proces remodelovanja, mada i lokalni medijatori koje luče osteoblasti, osteoklasti ili *lining* ćelije takođe mogu biti okidači procesa. Stromalne ćelije indukuju stvaranje pro-osteoblasta koji počinju da eksprimuju ligand receptorskog aktivatora nuklearnog faktora (NF) -  $\kappa$ B ligand (RANKL), na površini, zahvaljujući kojem dolazi do sazrevanja pro-osteoklasta u zrele osteoklaste čime započinje faza resorpcije. Glavni igrači u ovoj fazi, osteoklasti, se vezuju za koštani matriks, luče jone vodonika kako bi stvorili kiselo mikrookruženje i razgrađuju ga. Osteoklasti luče i niz drugih enzima, oslobođenih iz svojih lizozoma, koji su odgovorni za varenje organskog matriksa kostiju, kao što su kiselna fosfataza otporna na tartarat, matriks metaloproteinaza, katepsin K. Apoptoza višenuklearnih osteoklasta koja je kontrolisana estrogenima i drugim faktorima simbolizuje kraj faze resorpcije kosti. Tada pro-osteoblasti koji su sazreli u osteoblaste prestaju da stvaraju RANKL, a počinju sa stvaranjem osteoprotegerina koji blokira receptorski aktivator za nuklearni faktor  $\kappa$ B (RANK) i prekida aktivaciju pro-osteoklasta. Fazu resorpcije prati *reversal* faza koju karakteriše nestanak skoro svih osteoklasta. U fazi formiranja osteoblasti oblažu resorptivnu šupljinu nastalu dejstvom osteoklasta i počinju da sintetišu osteoid, koji dalje prolazi kroz proces mineralizacije tokom nekoliko meseci ili čak godina. Kada se mineralizacija završi, nastupa terminalna faza u kojoj se neki od osteoblasta podvrgavaju apoptozi, postaju *lining* osteoblasti ili ostaju ukopani u koštani matriks i na kraju se

diferenciraju u osteocite. Osteociti igraju ključnu ulogu u procesu koštanog remodelovanja, signalizirajući kraj istog sekrecijom antagonista osteogeneze. Tokom terminalne faze osteociti se međusobno povezuju i stvaraju novu signalnu mrežu. Faza mirovanja kosti se održava sve dok ne započne sledeći talas remodelovanja [90, 91, 93, 103, 104].



**Slika 4:** Proces remodelovanja kosti [93]

## 2.2. Biohemijski markeri koštanog metabolizma

Biohemijski markeri metaboličke aktivnosti kosti su po svojoj strukturi specifični molekuli koštanog tkiva, enzimi i neenzimski peptidi, detektabilni u serumu i urinu, koji se oslobađaju iz ćelija i nećelijskih struktura pri procesu izgradnje, odnosno razgradnje koštanog tkiva.

Biohemijski markeri se mogu podeliti u dve grupe:

1. biohemijski markeri koštanog formiranja (rezultat su aktivnosti osteoblasta): ukupna, odnosno koštano-specifična alkalna fosfataza, osteokalcin, karboksi-terminalni propeptid kolagena tip I – P1CP, amino-terminalni propeptid kolagena tip I – P1NP;

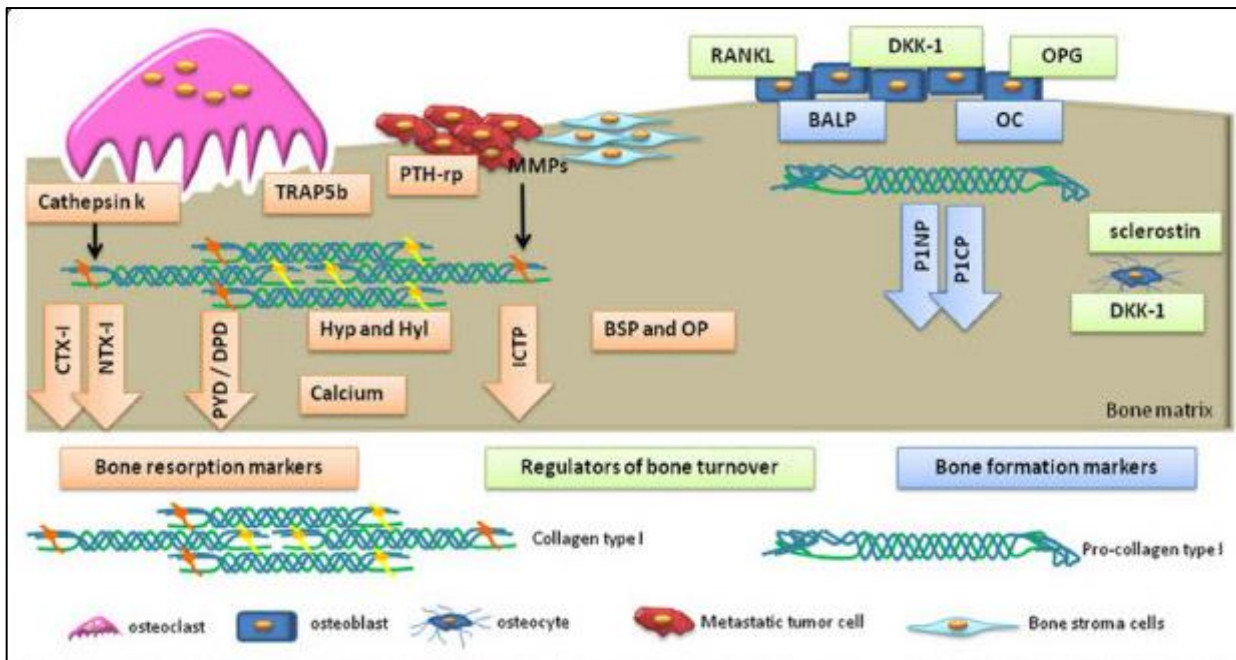
2. biohemijski markeri koštane resorpcije: kiselna fosfataza otporna na tartarat - TRAP, slobodan piridinolin i deokipiridinolin, N- ili C-terminalni telopeptid tipa I kolagena (CTX I i NTX I),  $\beta$ -Cross Laps (B-CTx). Povišene vrednosti ove grupe koštanih biomarkera u serumu

ili urinu ukazuju na viši stepen remodelovanja kostiju, odnosno na povećan gubitak koštane gustine [105, 106].

Biohemijski markeri koštanog formiranja, propeptidi prokolagena tipa I, potiču od kolagena tipa I, koji je najčešći tip kolagena koji se detektuje u mineralizovanoj kosti. U koštanom tkivu kolagen sintetišu osteoblasti u obliku prokolagena. Ovaj prekursor sadrži kratku sekvencu i terminalne ekstenzivne peptide: amino-terminalni propeptid (PINP) i karboksi-terminalni propeptid (PICP). Prokolagen je stoga, 50% duži molekul u odnosu na konačni protein, a njegova funkcija je sprečavanje prevremene agregacije molekula kolagena u fibrile unutar ćelije. Pre sazrevanja kolagenskih fibrila, ovi tzv. C- i N-propeptidi cepaju se sa prokolagena tipa I specifičnim vanćelijskim tkivnim proteinazama. Oba propeptida se mogu naći u cirkulaciji i njihova koncentracija odražava brzinu sinteze kolagena tipa I, odnosno brzinu koštanog formiranja. Iako PINP i PICP mogu nastati i iz drugih tkiva (koža, krvni sudovi, fibrohrskavica i tetive), većina neskeletnih tkiva pokazuje sporiji promet u odnosu na kost i veoma malo doprinose koncentraciji PINP-a u cirkulaciji. PINP se smatra najosetljivijim markerom formiranja kostiju i posebno je koristan za praćenje antiresorptivnih terapija [107]. Tokom procesa formiranja kosti osteoblasti takođe proizvode i osteokalcin, koji se izlučuje bubrezima i jedan je od najzastupljenijih nekolagenih proteina u kostima. Predstavlja visoko specifičan marker koštanog formiranja. Nakon sekrecije iz osteoblasta, uz prisustvo dovoljne količine vitamina K i vitamina D, vrši se njegova karboksilacija i vezivanje za hidroksiapatit. U slučaju nedostatka vitamina K ili vitamina D, osteokalcin se slabijim vezama vezuje za hidroksiapatit, te postoji povećana sklonost ka koštanim frakturama. Alkalna fosfataza (ALP), takođe predstavlja marker koštanog formiranja, mada specifičniji pokazatelj je njen izoenzim kost specifična ALP (engl. *bone specific alkaline phosphatase* - *BALP*). Nakon mineralizacije osteoida dolazi do izlučivanja ALP-a u cirkulaciju. Ovaj enzim se, pored kostiju, nalazi i u jetri, bubrezima, placenti i crevima. Od ukupne količine cirkulišuće ALP u krvi, oko 50% je koštanog, dok je oko 45% hepatičnog porekla. U periodu formiranja i rasta kosti, raste koncentracija ALP-e u cirkulaciji. Povišene vredosti se detektuju fiziološki tokom perioda detinjstva i adolescencije, i patološki u koštanim oboljenima koje karakteriše pojačano koštano formiranje [108, 109].

Tokom resorpcije kostiju, osteoklasti luče mešavinu kiselih i neutralnih proteaza koje razgrađuju vlakna kolagena u molekularne fragmente, odnosno u CTX-I i NTX-I. C-terminalni telopeptid kolagena tipa I predstavlja glavnu komponentu (~90%) proteinskog matriksa kosti. CTX-I je oktapeptid koji sadrži vezno mesto alfa-asparaginske kiseline koja

starenjem kosti prelazi u svoju beta formaciju, pa se naziva  $\beta$ -CTX ili  $\beta$ -CrossLaps. Beta-CTX se oslobađa u cirkulaciju tokom resorpcije kosti i služi kao specifičan marker degradacije zrelog kolagena tipa I. Predstavlja najbolji i najspecifičniji marker koštane resorpcije [110-112].



Slika 5: Biohemijski markeri koštanog remodelovanja [111]

### 2.1.2. RANK, RANKL i OPG

Kasnih 1990-ih godina otkrivena je jedinstvena signalna trijada sastavljena od tri proteina koja pripadaju superfamiliji faktora tumorske nekroze (TNF) i igraju ključnu ulogu u procesu remodelovanja koštanog tkiva:

- osteoprotegerin (OPG),
- receptorski aktivator nuklearnog faktora (NF) -  $\kappa$ B (engl. *receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B* - RANK),
- njegov ligand (engl. *receptor activator of nuclear factor -  $\kappa$ B ligand* - RANKL).

Pored koštanog remodelovanja, ova grupa proteina reguliše različite metaboličke i ćelijske procese, kao na primer, razvoj i sekreciju mlečnih žlezda, razvoj tumorskih ćelija i metastaziranje istih. Takođe, utiču i na stimulaciju, aktivaciju i preživljavanje ćelija imunog sistema. Poremećaj u radu ove RANKL/RANK/OPG (RRA) osovine doprinosi patogenezi koštanih i imunoloških bolesti, kao što su reumatoidni artritis, osteoporoza, dijabetes melitus i pojedine vrste tumora [113, 114].

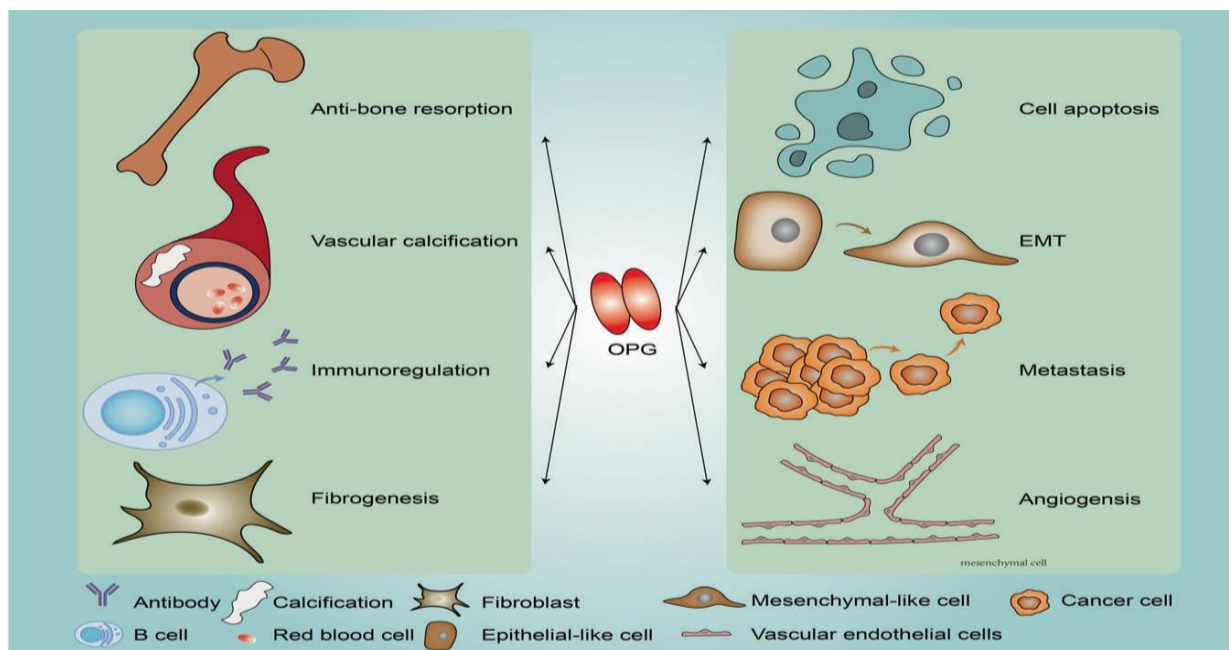
**Osteoprotegerin** (OPG) je citokinski *mamac* receptor sa osteoprotektivnom ulogom koji ima duboke inhibitorne efekte na diferencijaciju osteoklasta i koštanu resorpciju (lat. *os* – kost; *protegere* – zaštititi). OPG je poznat i pod nazivom inhibitorni faktor osteoklastogeneze (OCIF), 11b član superfamilije TNF receptora (TNFRS11B), kao i receptor-1 izveden iz folikularnih dendritskih ćelija (FDCR-1). Izolovan je 1997. godine, gotovo istovremeno, nezavisno od strane dve grupe naučnika, Simoneta i saradnika u Sjedinjenim Američkim Državama, odnosno Tsudua i saradnika u Japanu [115-117].

Kod odraslih OPG cirkuliše u serumu, a sekretuju ga stromalne ćelije koštane srži i osteoblasti, kao i ćelije drugih organa: ćelije pluća, srca, bubrega, jetre, timusa, limfnih čvorova, mozga, štitaste žlezde, glatkih mišićnih ćelija, zglobnih hondrocita, B-limfocita, ćelije tankog i debelog creva. OPG se nalazi u telu samo kao solubilni *mamac* receptor jer ne poseduje transmembranski domen, što ga razlikuje od ostalih članova superfamilije TNF receptora, za koje je tipično posedovanje transmembranskog dela. Primarni produkt OPG gena je propeptid izgrađen od 401 aminokiseline, a da bi OPG postao aktivan, odnosno zreo funkcionalni peptid, odvaja se N-terminalna signalna sekvenca (21 aminokiselina), tako da definitivni produkt OPG gena sadrži 380 aminokiselina i sedam domena za koje se vezuju receptori različitih funkcionalnosti [115, 118, 119].

OPG funkcioniše kao receptor *mamac* za pro-osteoblastni citokin RANKL. Njegova funkcija zasniva se na kompeticiji sa RANK-om, koji je eksprimiran na površini ćelije prekursora osteoklasta, odnosno na inhibiciji vezivanja i neutralizaciji RANK i RANKL-a. Biološki efekti OPG-a u koštanom tkivu suprotni su efektima RANKL-a, on inhibira maturaciju i aktivaciju osteoklasta, skraćuje njihov životni vek i stimuliše njihovu apoptozu, te ispoljava svoje antiresorptivno dejstvo. OPG je po svojoj strukturi homologan RANK-u i predstavlja endogenog antagonistu RANKL-a. Pored RANKL-a, identifikovani su brojni drugi OPG ligandi: sindekan-1, glikozaminoglikani (GAGs), von *Willebrand* faktor i faktor VIII [118, 120, 121].

Novi dokazi ukazuju na to da je OPG daleko izvan modulatora specifičnog za kost i da je uključen u više fizioloških i patoloških procesa. Dokazano je da OPG utiče na rast tumora i pojavu metastaza, na funkciju endotela, angiogenezu, pojavu fibroze, dijabetesa, prevenciju osteoporoze tokom trudnoće. Kao izlučeni protein, OPG vrši bioaktivne funkcije modulacijom različitih puteva transdukcije signala u ćelijama, kao i remodeliranje lokalnog mikrookruženja [117, 122, 123]. Pored navedenih, OPG igra značajnu ulogu i u imunomodulaciji. Yun i saradnici, kao i Skopet su pokazali da OPG reguliše sazrevanje i

razvoj B-limfocita, ali i stvaranje efikasnog imunog odgovora utičući na sintezu imunoglobulina. U populaciji OPG negativnih miševa populacija B-limfocita je povećana, štaviše, dendritske ćelije nastale kod ovih miševa imaju povećanu sposobnost stimulacije T-limfocita [124, 125].



**Slika 6:** Uloga osteoprotegerina u benignim i malignim procesima [117]

Ekspresija OPG se povećava delovanjem vitamina D3, interleukina (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF alfa (TNF $\alpha$ ), TNF beta (TNF $\beta$ ), 17- estradiola i *Wnt* signalnog puta (engl. *Wnt signaling pathway*), a smanjuje delovanjem prostaglandina E2 (PGE2), paratiroidnog hormona (PTH), glukokortikoida te insulinu sličnog faktora rasta (IGF-1). Više serumske koncentracija OPG-a se detektuju kod starijih, kod bolesnika na hroničnoj programu hemodijalize, a niže u trudnoći i tokom perioda dojenja, što može biti razlog za ubrzano obnavljanje kostiju u ovim uslovima [126, 127].

Nekoliko meseci nakon otkrića OPG-a četiri grupe naučnika su nezavisno, koristeći različite eksperimentalne sisteme, izolovale novog člana TNF superfamilije, transmembranski protein, koji se može vezati za OPG i RANK i dale mu različita imena: TNF-srodni aktivacijom indukovani citokin (TRANCE), aktivator receptora nuklearnog faktora (NF)-kB liganda (**RANKL**), osteoprotegerin ligand (OPGL) i faktor diferencijacije osteoklasta (ODF). TRANCE i RANKL su izolovani u imunološkim laboratorijama kao faktor koji igra ulogu u preživljavanju i aktivaciji dendritskih ćelija ili T-limfocita. OPGL i ODF su izolovani iz ćelija mijelomonocitne loze i stromalnih ćelija koštane srži kao faktor osteoklastogeneze [128].

RANKL je po strukturi homotrimerni protein i tipično je vezan za membranu osteoblastnih ćelija, ali ga proizvode i njihovi prekursori, osteociti i periostalne ćelije, kao i T, B-limfociti i megakariociti. Humani RANKL gen nalazi se na 13. hromozomu i kodira glikoprotein sa 317 aminokiselina [129, 130]. Postoje tri izoformna oblika RANKL-a: RANKL1, RANKL2 i RANKL3. RANKL1 predstavlja molekul pune dužine, dok kod oblika RANKL2 nedostaje intracelularni deo. U RANKL3, N-terminalna frakcija ne postoji. Ove tri izoforme na različite načine regulišu osteoklastogenezu, pri čemu forma 3 ima najmanju potentnost. RANKL postoji u dva oblika: membranskom i solubilnom, koji nastaje proteolitičkim cepanjem membranskog oblika. Solubilni oblik ima mali kapacitet za generisanje osteoklasta [128, 131, 132].

Većina faktora za koje je poznato da stimulišu koštanu resorpciju indukuju ekspresiju RANKL-a preko osteoblastnih stromalnih ćelija: paratiroidni hormon, PTHrP (engl. *Parathyroid hormone-related protein*), vitamin D3, interleukin-1 (IL-1), IL-11, IL-17, TNF $\alpha$ , prostaglandin E2 (PGE2). RANKL mogu eksprimirati i drugi organi pored kosti, kao što su timus, limfni čvorovi, pluća, mlečne žlezde, slezina i koštana srž. Poznato je da se RANKL eksprimira i u malignim ćelijama i da je uključen u svaku fazu razvoja maligniteta: od momenta nastanka prekanceroznih lezija pa sve do formiranja metastaza [133, 134].

RANKL, transmembranski vezan protein ekspimiran prvenstveno na površini osteoblasta i stromalnih ćelija koštane srži, se vezuje za RANK na površini prekursora osteoklasta, stimuliše osteoklastogenezu, pojačava adherenciju osteoklasta i stimuliše njihovu aktivaciju. Nakon vezivanja RANKL-a za RANK na površini osteoklasta pokreće se čitav niz signalnih puteva, koji prenose informacije ka jedru osteoklasta. Rezultat ovih reakcija je inhibicija apoptoze osteoklasta i favorizovanje procesa resorpcije kosti [135, 136].

RANKL i OPG su molekuli koji funkcionišu kao pozitivni i negativni regulatori koštane resorpcije. U fiziološkim uslovima postoji ravnoteža između koštane resorpcije i procesa formiranja kosti. Povećan odnos RANKL/OPG će favorizovati formiranje i aktivaciju osteoklasta i dovešće do koštane resorpcije. Nasuprot tome, smanjen odnos RANKL/OPG promovise formiranje kostiju inhibiranjem osteoklastične aktivnosti [109].

**RANK**, poznat i kao TRANCE receptor (TRANCE-R) ili 11a član superfamilije TNF receptora (TNFRS11A), otkriven je 1997. godine, od strane Andersona i saradnika, direktnim sekvenciranjem DNK iz humane mijeloidne dendritske ćelije. RANK je član TNF superfamilije receptora a po strukturi predstavlja transmembranski glikoprotein tipa I,

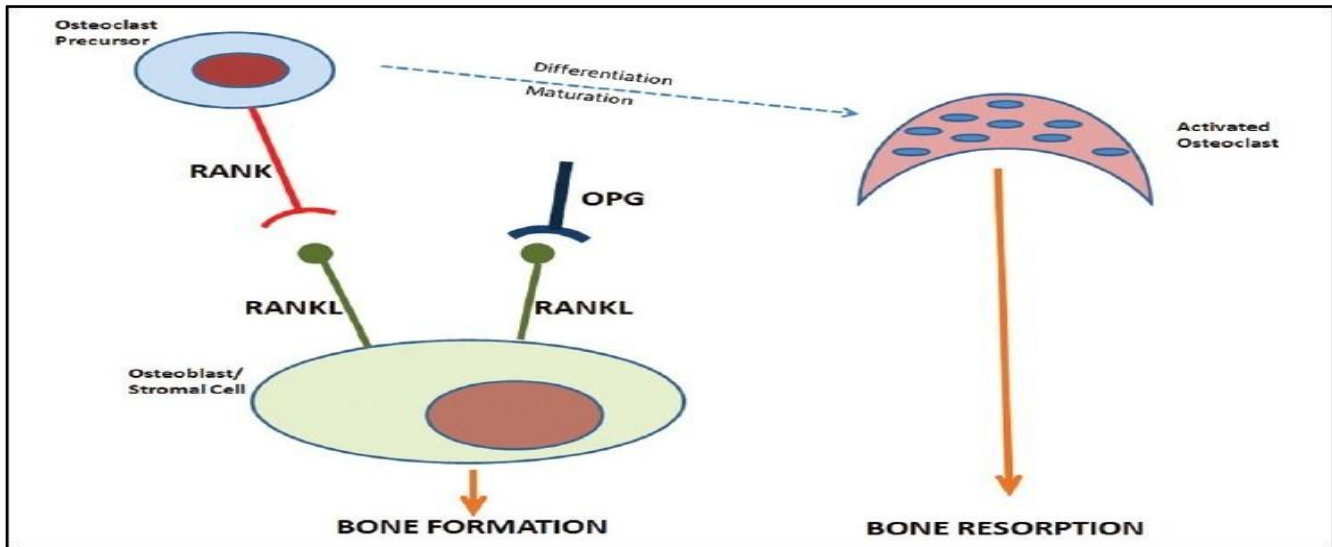


sastavljen od 616 aminokiselina. RANK je heterotrimer, poseduje signalni peptid i tri domena: ekstracelularni, transmembranski i citoplazmatski [137, 138].

Čini se da je RANK izražen u manjem broju tkiva u odnosu na RANKL, ali pored zrelih osteoklasta i dendritskih ćelija, eksprimiran je u mlečnim žlezdama, timusu, jetri, debelom i tankom crevu, nadbubrežnim žlezdama, T-limfocitima, Langerhansovim ćelijama i nekim tumorskim ćelijama, uključujući tumor dojke i prostate, koji predstavljaju tumore sa visokim metastatskim potencijalom u kostima [133, 139].

RANK je funkcionalni receptor za RANKL i OPG i deo je RANK/RANKL/OPG signalnog puta koji reguliše diferencijaciju i aktivaciju osteoklasta. Takođe, RANK je povezan sa funkcionisanjem imunog sistema, razvojem limfnih čvorova, termoregulacijom i razvojem mlečnih žlezda [139-141]. RANK stupa u interakciju sa više članova familije faktora povezanih sa TNF receptorom (engl. *TNF receptor-associated factor - TRAF*). TRAF 2, 5 i 6 se vežu za citoplazmatski domen RANK-a (samo je TRAF 6 esencijalan u osteoklastima) što stimuliše aktivaciju puteva c-jun N-terminalne kinaze (JNK) i NF-κB koji pokreću diferencijaciju i aktivaciju osteoklasta, a samim tim i resorpciju kosti. Ovaj sistem je uravnotežen relativnom ekspresijom OPG-a i RANKL-a, i čvrsto je regulisan mnogim faktorima uključujući hormone, imunološke signale i faktore rasta. Kada je ekspresija RANKL-a pojačana tada je ekspresija OPG-a smanjena ili se ne indukuje do istog nivoa kao RANKL, jer prekomerna ekspresija RANKL-a može izazvati pojačanu proizvodnju i aktivaciju osteoklasta, koji razgrađuju kost [142, 143]. Sa druge strane, u eksperimentalnim uslovima, miševi sa nedostatkom RANK-a i RANKL-a su pokazali smanjenu ili nepostojeću diferencijaciju osteoklasta, tešku osteopetrozu i imunološke defekte kao što je nedostatak limfnih čvorova [144].

Ekspresija RANK-a je stimulisana raznim citokinima (IL-1, IL-6, IL-11, TNF-a), glukokortikoidima i PTH-om [145].



**Slika 7:** RANKL/RANK/OPG sistem [134]

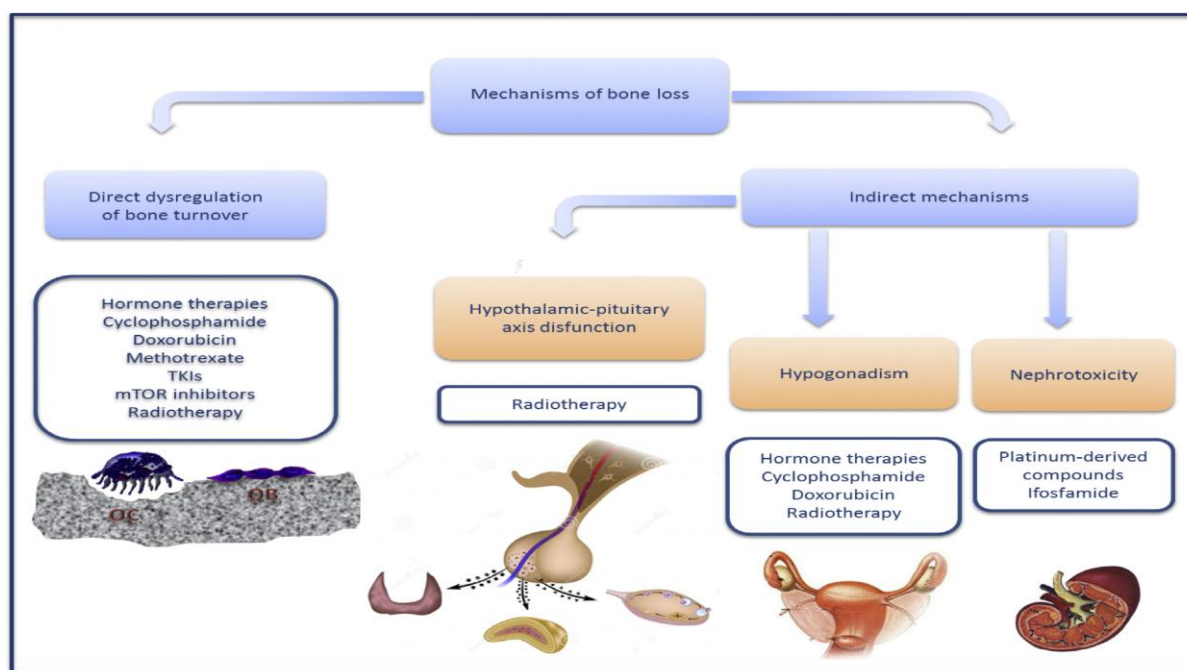
Disregulacija RANKL/RANK/OPG sistema je otkrivena kod nekoliko karcinoma, kao što su karcinom dojke, prostate, maligni tumori kostiju (npr. multipli mijelom, tumori džinovskih ćelija kostiju i hondroblastom), karcinom skvamoznih ćelija i Hočkinov limfom. Različiti hormoni, kao i proupalni citokini, deluju na osteoklaste putem RANKL/RANK signalnog puta, zbog čega dolazi do lokalne razgradnje kosti, što je vidljivo u reumatoidnom artritisu, multiplom mijelomu i kod osteolitičkih koštanih metastaza [138, 143, 144].

### 2.3. Koštani metabolizam u malignim bolestima

Koštano mikrookruženje predstavlja veoma plodno tlo za razvoj i preživljavanje malignih ćelija, kako primarnih koštanih tumora kao što su osteosarkom i Evingov sarkom, tako i metastaza solidnih tumora dojke i prostate, odnosno hematoloških maligniteta kao što je multipli mijelom. Kost je najčešće mesto metastatske bolesti, jer osteoblasti i osteoklasti proizvode brojne faktore koji stimulišu dalji rast tumorskih ćelija [146, 147].

Skoro svi maligni tumori mogu imati značajne negativne efekte na koštano tkivo. Gubitak koštane gustine uzrokovan malignitetom rezultat je višestrukih, međusobno povezanih faktora koji uključuju kako direktan efekat malignih ćelija kroz disregulaciju diferencijacije i aktivnosti osteoblasta i/ili osteoklasta, odnosno indirektan uticaj, kao rezultat razvoja hroničnih bubrežnih poremećaja i abnormalnosti elektrolita, kao i razvoja hipogonadizma. Drugi mehanizmi uključuju pro-apoptotički efekat na osteoblaste, osteoklaste

i osteocite kao i ubranu diferencijaciju stromalnih ćelija koštane srži u adipocite. Smanjenje mineralne koštane gustine uzrokovano hemioterapijom je dobro poznata komplikacija lečenja malignih bolesti. Nekoliko hormonalnih i nehormonalnih terapija (endokrina terapija u tretmanu tumora dojke, terapija deprivacije androgena - ADT za lečenje tumora prostate) ima potencijal da promoviše gubitak koštane gustine kroz direktnu disregulaciju koštanog metabolizma i indirektno, dovodeći do razvoja hipogonadizma. Takođe je poznato da i antineoplastični lekovi kao što su platinska jedinjenja (cisplatin), alkilirajući agensi (ifosfamid, ciklofosfamid, doksorubicin), antimetaboliti (metotreksat), inhibitori tirozin kinaze i glukokortikoidi dovode do značajnog smanjenja koštane gustine [146, 148-151].



**Slika 8.:** Mehanizmi koštanog gubitka od strane najčešćih hemioterapijskih lekova [149]

Do sada se veliki broj studija bavio predmetom koštanog metabolizma odraslih bolesnika sa solidnim malignitetima, poput tumora dojke i prostate, kao i dece, odnosno adolescenata obolelih od hematoloških neoplazmi. Sa druge strane, postoji tek nekoliko studija koje ispituju funkcionalni status kosti adultnih bolesnika sa hematološkim malignitetima [85, 146, 148, 152, 161].

Primena različitih antilimfomskih protokola može biti praćena brojnim nuspojavama. Visokodozna hemioterapija često u kombinaciji sa sledstvenom autologom transplantacijom matičnih ćelija hematopoeze može dovesti do preranog gubitka kosti i povećanja rizika od nastanka patoloških preloma kičmenih pršljenova i kuka. Hemioterapijski režimi lečenja limfoma se sastoje od brojnih lekova što dodatno otežava razgraničenje uticaja pojedinačnih

agenasa na koštanog metabolizam i identifikaciju koji agens i u kojoj meri doprinosi gubitku kosti [85]. Gubitak koštane gustine izazvan glukokortikoidima je uzrokovan povećanom stopom apoptoze osteoblasta i osteocita, poremećenom diferencijacijom osteoblasta i produženom aktivnošću osteoklasta [162]. Alkilirajuća sredstva takođe mogu da izazovu oštećenje gonada i posledično utiču na metabolizam kostiju [163]. Kod većine bolesnika sa limfomima se već prilikom postavljanja dijagnoze detektuje smanjenje koštane gustine u vidu osteopenije ili čak osteoporoze [164,165]. Pacijenti sa limfomom imaju signifikantno manju koštanu gustinu u poređenju sa opštom populacijom [160].

## II CILJEVI ISTRAŽIVANJA:

1. Utvrditi stepen promena koštane gustine (BMD-g/cm<sup>2</sup>) kod bolesnika sa novodijagnostikovanim B-ćelijskim nehoćkinskim limfomima šest meseci nakon početka lečenja u odnosu na koštanu gustinu izmerenu pre uvođenja terapije.
2. Utvrditi razliku u stepenu promena koštane gustine (BMD-g/cm<sup>2</sup>) šest meseci nakon početka primene monoklonskog anti-CD20 antitela u odnosu na kontrolnu grupu bolesnika lečenih standardnim hemioterapijskim protokolima.
3. Utvrditi razliku u stepenu promena koštanih biohemijskih markera i RANKL/OPG sistema šest meseci nakon uvođenja terapije monoklonskim anti-CD20 antitelom u poređenju sa kontrolnom grupom bolesnika lečenih standardnim hemioterapijskim protokolima.

### **III HIPOTEZE**

1. Kod bolesnika sa novodijagnostikovanim B-ćelijskim limfomima dolazi do smanjenja koštane gustine šest meseci nakon uvođenja terapije u odnosu na koštanu gustinu pre početka lečenja.
2. Postoji statistički značajna razlika u stepenu promena koštane gustine kod bolesnika lečenih monoklonskim anti-CD20 antitelom u poređenju sa bolesnicima lečenih standardnim hemioterapijskim protokolima.
3. Postoji statistički značajna razlika u promeni nivoa koštanih biohemijskih markera i RANKL/OPG sistema kod bolesnika lečenih standardnim hemioterapijskim protokolima sa anti-CD20 antitelom, u poređenju sa kontrolnom grupom u smislu smanjenja koštane resorpcije.

## **IV MATERIJAL I METODE**

### **1. MATERIJAL**

#### **1.1. Tip studije**

Sprovedena je prospektivna kohortna studija koja je obuhvatila 60 odraslih ispitanika, oba pola, kod kojih je po prvi put postavljena dijagnoza B – non-Hodgkin limfoma koji zahteva lečenje imunoterapijom i/ili polihemioterapijom.

#### **1.2 Mesto istraživanja**

Studija je sprovedena u Klinici za hematologiju i Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Vojvodine u Novom Sadu u periodu od oktobra 2016. do aprila 2020. godine. Sprovođenje studije odobrio je Etički komitet Kliničkog centra Vojvodine kao i Etički komitet Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu.

#### **1.3. Način izbora, veličina i konstrukcija uzorka**

U istraživanje je uključeno 60 novodijagnostikovanih ispitanika sa B-ćelijskim nehoćkinskim limfomom koji su podeljeni u dve grupe, na osnovu terapijskog pristupa. Ispitivanu grupu je činilo 30 ispitanika lečenih monoklonskim anti-CD20 antitelom uz polihemioterapiju, dok su kontrolnu grupu činili ispitanici lečeni standardnim hemioterapijskim protokolima bez primene monoklonskog anti-CD20 antitela.

Kriterijumi za uključivanje ispitanika u istraživanje:

1. Novodijagnostikovani bolesnici sa B-NHL-a,
2. Prethodno nelečeni bolesnici sa B-NHL-a,
3. Stariji od 18 godina,
3. Potpisana saglasnost za učešće u istraživanju.

Kriterijumi za isključivanje iz istraživanja su bili:

1. Novonastala fraktura kosti (unutar dva meseca od momenta postavljanja dijagnoze);
2. Prethodna primena kortikosteroidne terapije (duže od 3 meseca);
3. Upotreba medikamenata sa mogućom reperkusijom na koštano tkivo (inhibitori aromataze, primena niskomolekularnog heparina, hormonska supstitucija, suprafiziološke doze L-tiroksina, antidijabetici, antipsihotici, antikonvulzivni lekovi);

4. Komorbiditeti koji utiču na koštano remodelovanje (sindrom loše apsorpcije, endokrinološke bolesti: hipertireoidizam, hipotireoidizam, hiperprolaktinemija, hiperparatireoidizam, hipoparatireoidizam, akromegalija, Kušingova bolest; hronična bubrežna i jetrena insuficijencija);

5. Postojanje druge maligne bolesti i duži period imobilizacije.

## 2. METODE

### 2.1. Klinička i laboratorijska ispitivanja

Dijagnoza bolesti (NHL) je postavljena na osnovu anamneze, kliničkog pregleda, standardnih laboratorijskih i dopunskih hematoloških ispitivanja, kao i histopatološkom i imunohistohemijskom analizom tumorskog tkiva, dobijenog biopsijom ili ekstirpacijom tkiva limfnog čvora ili drugih ektranodalnih lokalizacija u skladu sa kriterijumima klasifikacije hematoloških tumora Svetske zdravstvene organizacije iz 2022. godine (*WHO-HAEM5 classification*). Nakon postavljanja dijagnoze kod svih ispitanika urađena je procena kliničkog stadijuma bolesti u skladu sa An Arbor klasifikacijom i opšteg funkcionalnog stanja prema ECOG skali (engl. *Eastern Cooperative Oncology Group*).

**Tabela 2.** An Arbor klasifikacija [55]

<b>I stadijum</b>	Zahvaćenost jedne regije limfnih čvorova ili zahvaćenost jednog ekstralimfatičnog organa (IE)
<b>II stadijum</b>	Zahvaćenost dve ili više regija limfnih čvorova sa iste strane dijafragme ili zahvaćenost jednog ekstralimfatičnog organa sa jednom ili više grupa limfnih čvorova sa iste strane dijafragme (stadijum II E)
<b>III stadijum</b>	Zahvaćenost više grupa limfnih čvorova sa obe strane dijafragme ili lokalna zahvaćenost ekstralimfatičnog organa ili tkiva (IIIE) ili slezine (IIIS) ili oba (IIISE)
<b>IV stadijum</b>	Difuzna zahvaćenost jednog ili više ekstralimfatičnih organa ili tkiva, sa ili bez zahvaćenosti limfnih čvorova Bilo koje zahvatanje likvora, koštane srži, jetre ili višestruke lezije pluća
<b>Podstadijum:</b>	
E Lokalizovana, ektranodalna bolest (N = limfni čvor, H = jetra, L= pluća, S = slezina, D = koža, O = kost, P = plućna maramica, M = koštana srž)	
A Odsustvo sistemskih znakova	
B Prisustvo neobjašnjivog gubitka telesne težine (10% za 6 meseci), i/ili neobjašnjive temperturegroznice, i/ili noćnog preznojanja	



**Tabela 3.** ECOG PS [48]

<b>ECOG 0</b>	Potpuno aktivni, bez simptoma, bez ograničenja u fizičkim aktivnostima
<b>ECOG 1</b>	Ograničeni u fizički napornim aktivnostima, simptomatski bolesnici, sposobni da obavljaju posao lake ili sedeće prirode. Mogu se lečiti u ambulantnim uslovima.
<b>ECOG 2</b>	Simptomatski bolesnici koji su vezani za postelju, ali < od 50% budnih sati
<b>ECOG 3</b>	Simptomatski bolesnici koji su vezani za postelju, ali > od 50% budnih sati
<b>ECOG 4</b>	Bolesnici koji su vezani za postelju, kompletno onesposobljeni za bilo kakvu dnevnu aktivnost
<b>ECOG 5</b>	Smrtni ishod

Anamnezom i uvidom u medicinsku dokumentaciju dobijeni su neophodni demografski podaci i podaci o komorbiditetima ispitanika. U zavisnosti od tipa nehoćinskog limfoma korišćeni su aktuelni prognozni indeksi (prilog br. 1).

Po uključivanju u studiju, a pre sprovođenja planirane imunoterapije i/ili polihemioterapije kod svakog ispitanika urađeno je:

- Anamneza i klinički pregled;
- Uzorkovanje krvi za hematološke, biohemijske, hemostazeološke i parametre metaboličke aktivnosti kosti. Rađena je kompletna krvna slika, broj retikulocita, određivane su serumske koncentracije C reaktivnog proteina (CRP), uree, kreatinina, mokraćne kiseline, laktat dehidrogenaze (LDH), glukoze (ŠUK), ukupnih proteina, elektroforeza serumskih proteina, određivane su serumske koncentracije ukupnog i direktnog bilirubina, gvožđa, transferina, feritina, amilaza, alanin transaminaze (ALT), gama glutamil transpeptidaze (GGT), alkalne fosfataze (ALP), elektrolita: natrijuma (Na), kalijuma (K), hlora (Cl), ukupnog i jonizivanog kalcijuma (Ca), magnezijuma (Mg), fosfora (P), imunoglobulina IgG, IgM, IgA, C3, C4 komplementa, lipidnog statusa (ukupni holesterol, trigliceridi, HDL - holesterol, LDL - holesterol). Od hemostazeoloških nalaza određivana je plazmatska koncentracija fibrinogena, trombinsko vreme (TT), protrombinsko vreme (PT), aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme (aPTT) i euglobulinsko vreme lize koaguluma. Određivane su serumske koncentracije paratireoidnog hormona (PTH), vitamina D, CrossLaps-a, osteokalcina, P1NP-a, osteoprotegerina, RANKL-a, folikulostimulirajućeg hormona (FSH), luteinizirajućeg hormona (LH), estradiola i testosterona. Uzorci krvi su uzorkovani natašte u EDTA epruvete i serum separator epruvete. Plazma i serum su odvojeni u roku od 60 minuta od momenta uzorkovanja i odmah zamrznuti na -80°C

do momenta analize. Sva merenja su obavljena prema uputstvima proizvođača i prema centralizovanom sistemu laboratorije Kliničkog centra Vojvodine sa ciljem smanjenja analitičkih varijacija;

- Osteodenzitometrijsko merenje – engl. *Dual Energy X-Ray Absorptiometry (DXA)*: merenje mineralne koštane gustine (engl. *Bone Mineral Density - BMD*) na lumbalnoj kičmi, kuku i vratu butne kosti, metodom dvostruke energetske apsorpcije X zracima (DXA) na aparatu *Lunar Prodigy*. Izmerena koštana gustina je izražena u apsolutnim vrednostima BMD (g/cm<sup>2</sup>) i u vidu T-skora. T-skor predstavlja odstupanje izmerene koštane gustine bolesnika, izražen u standardnim devijacijama (SD), od srednje vrednosti gustine kosti zdravih mladih osoba iste rase, pola, visine i težine. Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) uredan nalaz predstavlja T skor iznad -1SD, vrednosti između -1 SD i > -2,5 SD osteopeniju, a nalaz mineralne koštane gustine od  $\leq -2,5$  SD osteoporozu, dok prisustvo preloma na malu traumu označava prisustvo teške osteoporoze komplikovane prelomom [82].

Kod svih ispitanika izračunat je indeks telesne mase (engl. *Body Mass Index – BMI*) koji predstavlja kvantitativan odnos telesne težine izražene u kilogramima i telesne visine izražene u m<sup>2</sup> ( $BMI = TT(kg)/TV(m^2)$ ).

Pothranjenost se označava kao  $BMI \leq 18,5 \text{ kg/m}^2$ , BMI između  $\leq 18,5 \text{ kg/m}^2$  i  $25 \text{ kg/m}^2$  podrazumeva normalnu uhranjenost, BMI vrednosti između  $25 \text{ kg/m}^2$  i  $29,9 \text{ kg/m}^2$  predgojaznost,  $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$  gojaznost, dok BMI iznad  $35 \text{ kg/m}^2$  označava patološki tip gojaznosti [83].

Ispitivana grupa je lečena primenom monoklonskog anti-CD20 antitela u kombinaciji sa ciklofosfamidom, doksorubicinom, vinkrtistinom i prednizonom (CHOP) i *CHOP-like* protokolima dok je kontrolna grupa bila podvrgnuta primeni polihemioterapije (takođe CHOP i *CHOP-like* protokolima, ali bez primene anti-CD20 antitela). R-CHOP-21 protokol je podrazumevao primenu ciklofosfamida  $750 \text{ mg/m}^2$ , doksorubicina  $50 \text{ mg/m}^2$ , vinkristina  $1,4 \text{ mg/m}^2$  (maksimalna doza  $2 \text{ mg}$ ) i rituksimaba  $375 \text{ mg/m}^2$ , tokom prvog dana, uz  $100 \text{ mg}$  prednizona tokom prvih pet dana ciklusa. R-CVP protokol u odnosu na R-CHOP protokol se razlikuje u primeni doxorubicina, koji nije sastavni deo R-CVP, odnosno CVP protokola. Ciklusi su primenjivani na 21 dan. Ispitanici koji su dobijali R-CHOEP su pored gore nabrojanih lekova primali i Etopozid (Vepesid)  $100 \text{ mg/m}^2$  od 1. do 3. dana ciklusa. Prva grupa ispitanika pre primene monoklonskog anti-CD20 antitela primila je kortikosteroidnu premedikaciju ( $100 \text{ mg}$  metilprednizolona i.v.). Većina hemioterapijskih protokola, kao što su

CHOP i CVP, uključuju između 60 i 100mg prednizona oralno, jednom dnevno tokom 5 dana, pri čemu najčešće bolesnici primaju 6 do 8 ciklusa polihemioterapije, svake 3 ili 4 nedelje. S obzirom na to da su pojedini ispitanici, uključeni u studiju, primili različitu dozu različitih vrsta kortikosteroida koji su sastavni delovi hemioterapijskih protokola, kao i premedikacijskih režima (metilprednizolon, prednizon), računata je kumulativna doza kortikosteroidne terapije, konvertovana u doze prednizona prema jedinici telesne površine ispitanika ( $m^2$ ).

Po završenom lečenju odnosno šest meseci nakon započinjanja lečenja, svim ispitanicima obe grupe su urađeni isti pregledi kao i inicijalno, uključujući laboratorijske analize i osteodenzitometrijsko merenje koštane gustine. Terapijski odgovor je procenjivan u skladu sa RECIL kriterijumima iz 2017. godine.

## **2.2. Metode statističke obrade podataka**

U cilju uvida u raspodelu podataka, korišćena je analiza deskriptivnih pokazatelja. Kolmogorov-Smirnov testom utvrđeno je da sve varijable odstupaju svojom raspodelom od normalne distribucije ( $p < 0,05$ ), te su u cilju provere hipoteza korišćene neparametrijske statističke metode. Hipoteze koje su iziskivale poređenje dve grupe pacijenata (koje primaju i ne primaju terapiju), ispitane su primenom Men-Vitni-U testa, kao neparametrijskom zamenom za t-test za nezavisne uzorke, dok je poređenje varijabli u kontekstu hipoteza ponovljenog merenja izvršeno putem Vilkoksonovog testa ranga, odnosno neparametrijskom zamenom za t-testa za zavisne uzorke. Prilikom poređenja kontrolne grupe i grupa dizufnog i folikularnog karaktera korišćena je ANOVA, odnosno njena parametrijska zamena (Kruskal-Valisov test). Poređenje grupa (odnosno utvrđivanje razlika među njima) na varijablama kategorijalnog tipa vršeno je putem hi-kvadrat testa. Relacije među varijablama utvrđene su korišćenjem Spirmanovog koeficijenta korelacije s obzirom na odstupanje od normalne raspodele, dok su efekti prediktorskih varijabli u poslednjem delu rezultata na indekse koštane mase utvrđene setom višestrukih regresionih analiza. Statistička obrada podataka odrađena je u programu SPSS v.26.

## V REZULTATI

### 1. DEMOGRAFSKI PODACI

U istraživanje je uključeno ukupno 60 ispitanika sa novodijagnostikovanim B-ćelijskim nehoćkinskim limfomom. Ispitanici su bili podeljeni u dve grupe:

- ispitivanu grupu, sa 30 ispitanika lećenih kombinacijom standardnih hemioterapijskih protokola i antiCD-20 monoklonskim antitelom (rituksimab - R);
- kontrolnu grupu, sa 30 ispitanika lećenih isključivo primenom standardnih hemioterapijskih protokola (CHOP i *CHOP-like*).

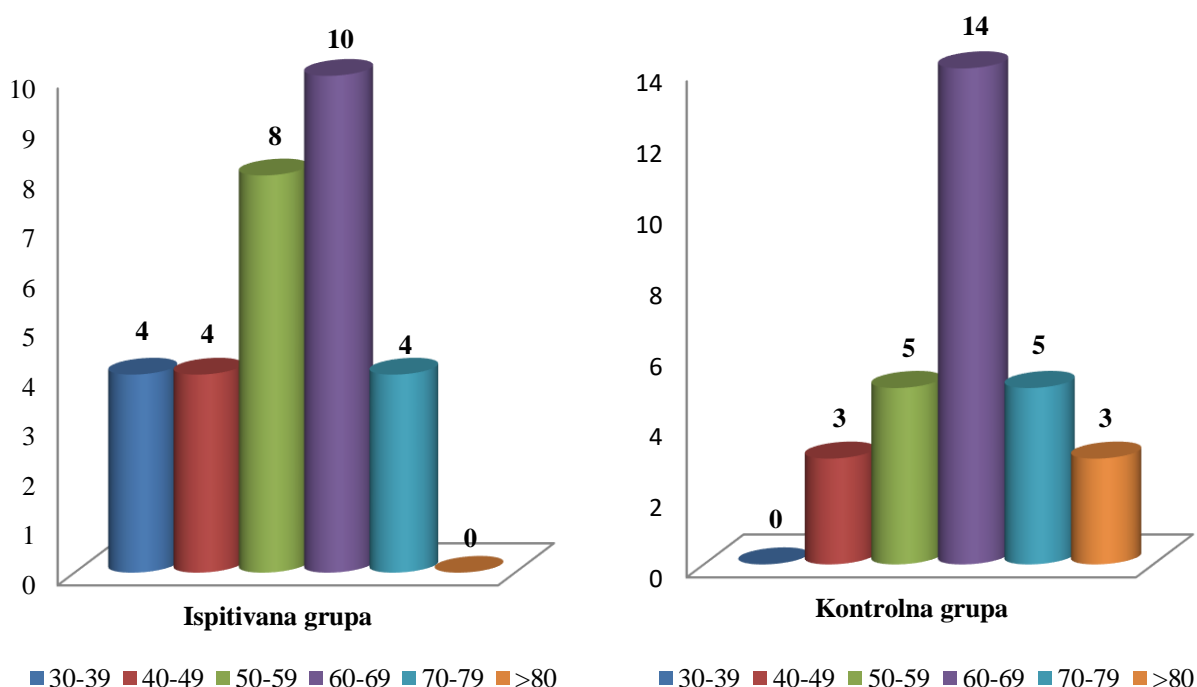
U obe grupe ispitanika dominirale su osobe muškog pola, u ispitivanoj grupi taj procenat je iznosio 56,7%, dok je u kontrolnoj grupi zastupljenost muške populacije bila veća i iznosila je 66,7%. Nije postojala statistički značajna razlika u odnosu na pol između dve grupe ispitanika ( $\chi^2=0,07$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,43$ ) (tabela 4.).

**Tabela 4.** Polna struktura uzorka

Grupa	Pol (n) m/ž
Ispitivana grupa (n = 30)	17/13
Kontrolna grupa (n = 30)	20/10
Statistička značajnost (p)	0,43

Prosečna starost u ispitivanoj grupi je bila  $56,73 \pm 12,42$  (34-78) godina, dok je kontrolna grupa bila nešto starija. Prosečna starost ispitanika u kontrolnoj grupi iznosila je  $64,33 \pm 10,88$  (40-82) godine. Studentovim t-testom za nezavisne uzorke nije ustanovljena statistička značajna razlika u odnosu na godine života između ove dve grupe ispitanika ( $t = -0,95$ ,  $p = 0,34$ ). Vrednost medijane ukupnog uzorka iznosila je 63,5 godina. Medijana starosti ispitivane grupe je bila 57 godina, dok je kod ispitanika kontrolne grupe medijana iznosila 65,5 godina. Ukupno najveći broj ispitanika je bio starosti između 60 i 70 godina, u ispitivanoj grupi njih 10 (33,3%), odnosno u kontrolnoj grupi 14 ispitanika (46,6%) (grafikon 1).

**Grafikon 1.** Starosna struktura ispitanika



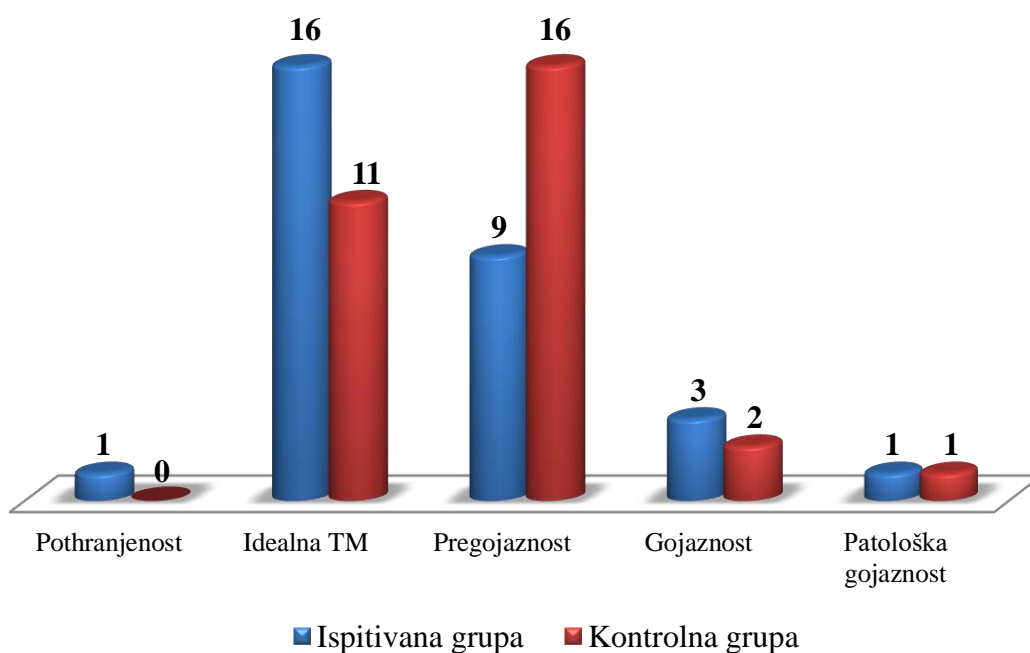
Telesna visina u obe grupe ispitanika je bila gotovo identična (169 cm), dok je telesna težina bila veća u kontrolnoj grupi (tabela 5). Nije postojala statistička značajnost dve grupe ispitanika u odnosu na visinu ( $t = 0,04$ ,  $p = 0,97$ ) i težinu ( $t = 1,11$ ,  $p = 0,27$ ).

**Tabela 5.** Antropometrijski parametri ispitanika

Grupa	Telesna težina (kg)				Telesna visina (cm)			
	$\bar{x}$	SD	Min	Max	$\bar{x}$	SD	Min	Max
<b>Ispitivana grupa</b>	71,98	16,07	41	99	169,7	11,94	152	194
<b>Kontrolna grupa</b>	76,46	15,06	41	130	169,8	9,53	141	188
<b>Statistička značajnost (p)</b>	0,97				0,27			

Normalnu telesnu masu je imalo 45% ispitanika (27/60) uključenih u naše istraživanje. Od ukupno 60 ispitanika, više od polovine, tačnije 32 ispitanika (53,3%) je imalo vrednost BMI-a iznad  $25\text{kg/m}^2$ , odnosno bilo je predgojazno ili gojazno (grafikon 2).

**Grafikon 2.** Distribucija ispitanika u odnosu na BMI kategorije



Prema podacima iz tabele 6, poređenjem indeksa telesne mase (BMI) ispitivane i kontrolne grupe, Studentovim t-testom za nezavisne uzorke, je utvrđeno, da ne postoje statistički značajne razlike između dve grupe ispitanika u odnosu na BMI ( $t(58) = 1,46$ ,  $p = 0,15$ ).

**Tabela 6.** Vrednosti indeksa telesne mase (BMI) u ispitivanim grupama

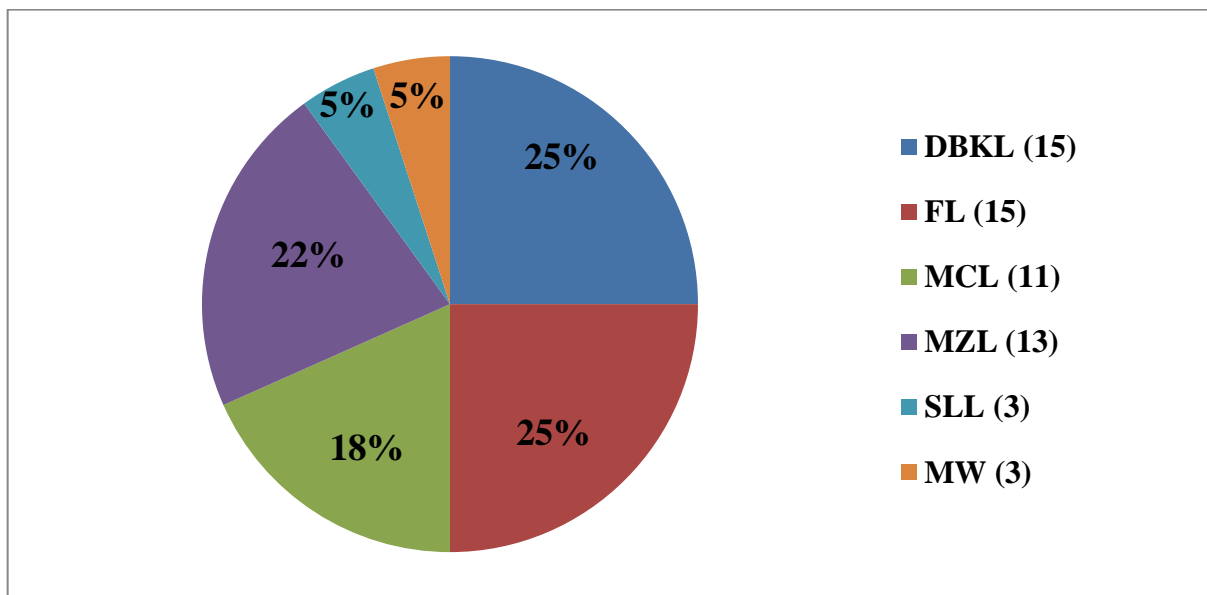
Grupa	BMI (kg/m <sup>2</sup> )			
	$\bar{x}$	SD	Min	Max
Ispitivana grupa	26,33	3,54	20,60	36,80
Kontrolna grupa	24,76	4,71	16,20	40,20
Statistička značajnost (p)	0,15			

## 2. KLINIČKE KARAKTERISTIKE OSNOVNE BOLESTI I ISPITANIKA

### 2.1. Dijagnoza osnovne bolesti

Kod najvećeg broja ispitanika je postavljena dijagnoza difuznog B-krupnoćelijskog limfoma – DBKL 15/60 (25%), odnosno folikularnog limfoma - FL (25%, 15/60). Limfom marginalne zone je imalo 13 ispitanika (22%), dok je kod 11 ispitanika dijagnostikovano limfom plaštanih ćelija (mantle ćelijski limfom). U 5% (3/60) ispitanika je dijagnostikovano limfom malih limfocita i *Waldenstromova* makroglobulinemija (Grafikon 3). Drugi podtipovi B-nehoćinskih limfoma nisu bili uključeni u istraživanje.

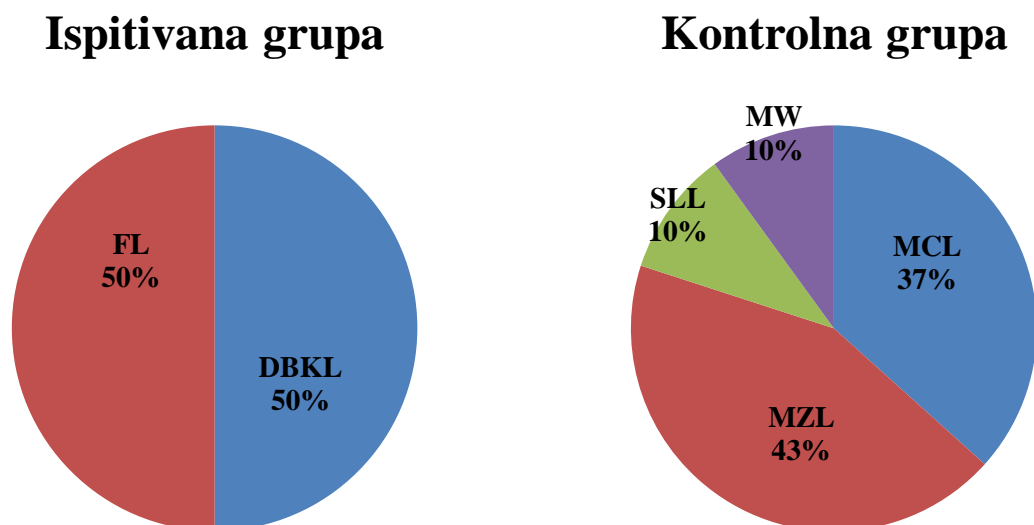
**Grafikon 3.** Struktura ukupnog uzorka prema dijagnozi osnovne bolesti



(DBKL – difuzni B krupnoćelijski limfom, FL – folikularni limfom, MCL – mantle ćelijski limfom, MZL – limfom marginalne zone, SLL – limfom malih limfocita, MW – Waldenstromova mikroglobulinemija)

U ispitivanoj grupi uključeno je 15 ispitanika sa DBKL-om i 15 ispitanika sa FL-om, dok je u kontrolnoj grupi uključeno 13 ispitanika sa MZL-om, 11 sa MCL-om, i po 3 ispitanika sa limfomom malih limfocita i *Waldenstrom-ovom* mikroglobulinemijom (grafikon 4).

**Grafikon 4.** Struktura ispitivane i kontrolne grupe prema dijagnozi osnovne bolesti



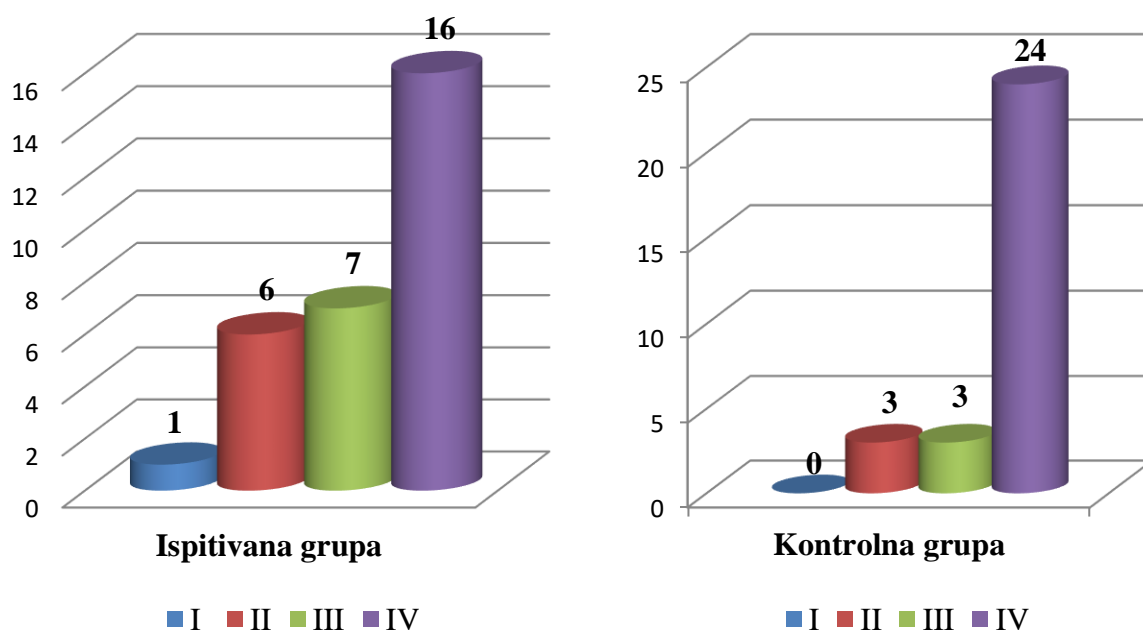
(DBKL – difuzni B krupnoćelijski limfom, FL – folikularni limfom, MCL – mantle ćelijski limfom, MZL – limfom marginalne zone, SLL – limfom malih limfocita, MW – Waldenstromova mikroglobulinemija)

## 2.2 Klinički stadijum bolesti, prisustvo B simptoma i ekстранodalne lokalizacije

U obe grupe ispitanika, najveći broj je dijagnostikovani u uznapredovalom kliničkom stadijumu bolesti. Ukupno u obe grupe, 66,6% ispitanika je bilo u IV kliničkom stadijumu, prema An Arbor klasifikaciji (Grafikon 5). U ispitivanoj grupi, u IV kliničkom stadijumu, je bilo 53,3% ispitanika, dok je u kontrolnoj grupi bilo 80% ispitanika u IV kliničkom stadijumu ( $p=0,028$ ). Postoji statistički značajna razlika između dve grupe ispitanika koji su dijagnostikovani u IV kliničkom stadijumu bolesti. B-simptome pre početka lečenja imala je većina ispitanika, u ispitivanoj grupi B-simptome je navelo 73,3% ispitanika (22/30), dok je u kontrolnoj grupi B-simptome imalo 80% ispitanika (24/30). *Bulky* bolest je potvrđena kod 10 ispitanika ispitivane grupe, odnosno kod četiri ispitanika kontrolne grupe.

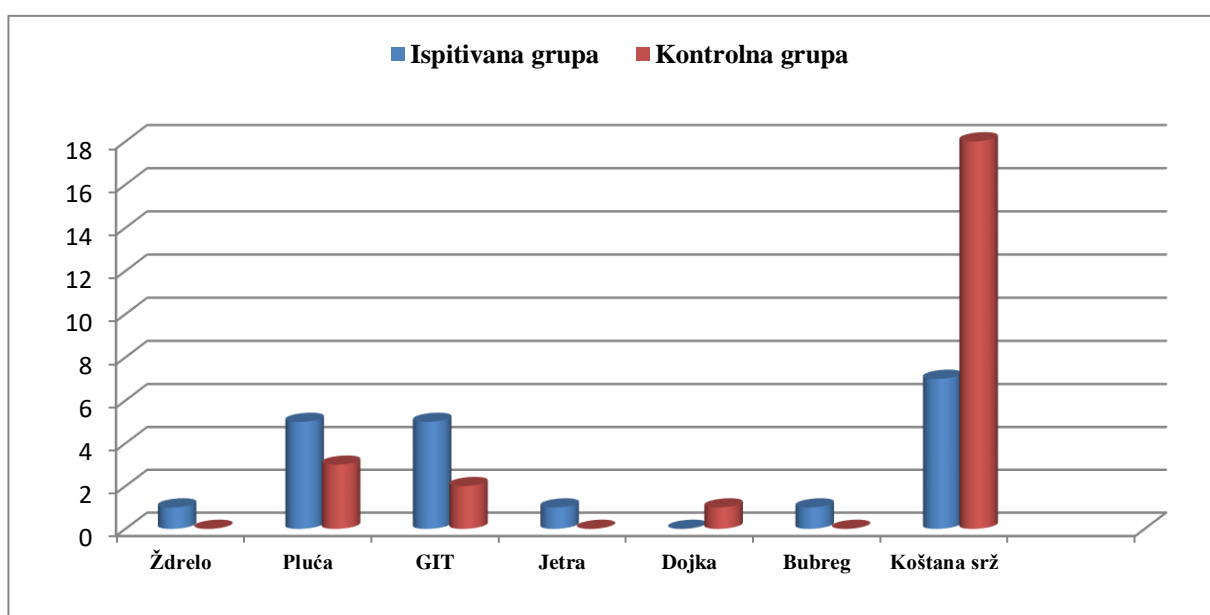


**Grafikon 5.** Distribucija ispitanika u odnosu na klinički stadijum bolesti



U ispitivanoj grupi, 21 pripadnik (70%) je imao primarno ekстранodalnu lokalizaciju bolesti, dok je u kontrolnoj grupi taj broj bio viši i iznosio je 24 (80%). Ekстранodalne lokalizacije u obe grupe ispitanika prikazane su na grafikonu 6. Najčešća ekстранodalna lokalizacija je bila koštana srž. Infiltracija koštane srži bila je češća u kontrolnoj grupi ispitanika u odnosu na ispitivanu grupu ( $p=0,0035$ ).

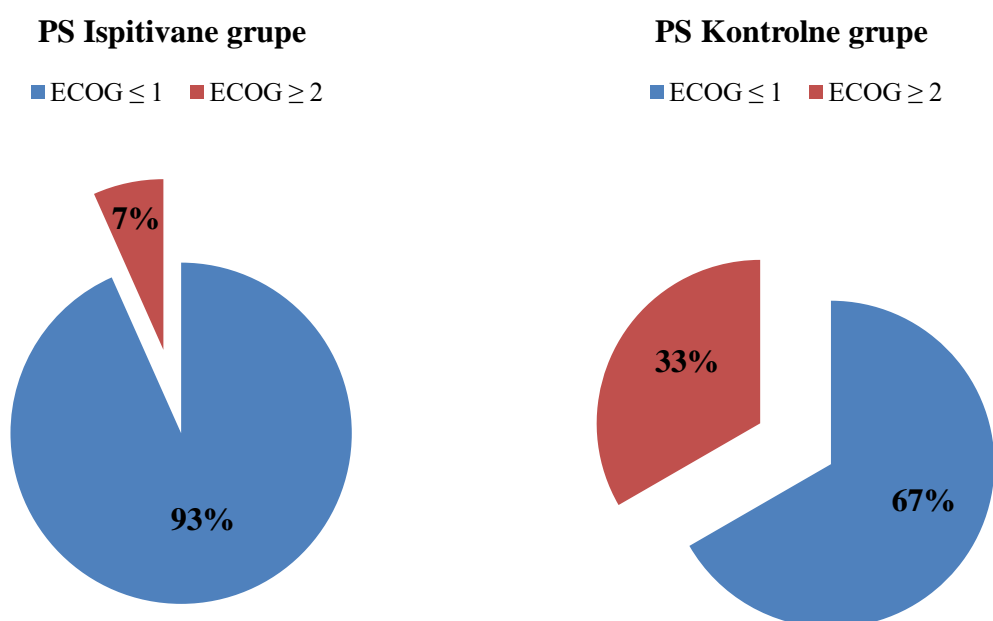
**Grafikon 6.** Ekстранodalna lokalizacija



### 2.3 ECOG performans status i komorbiditeti ispitanika

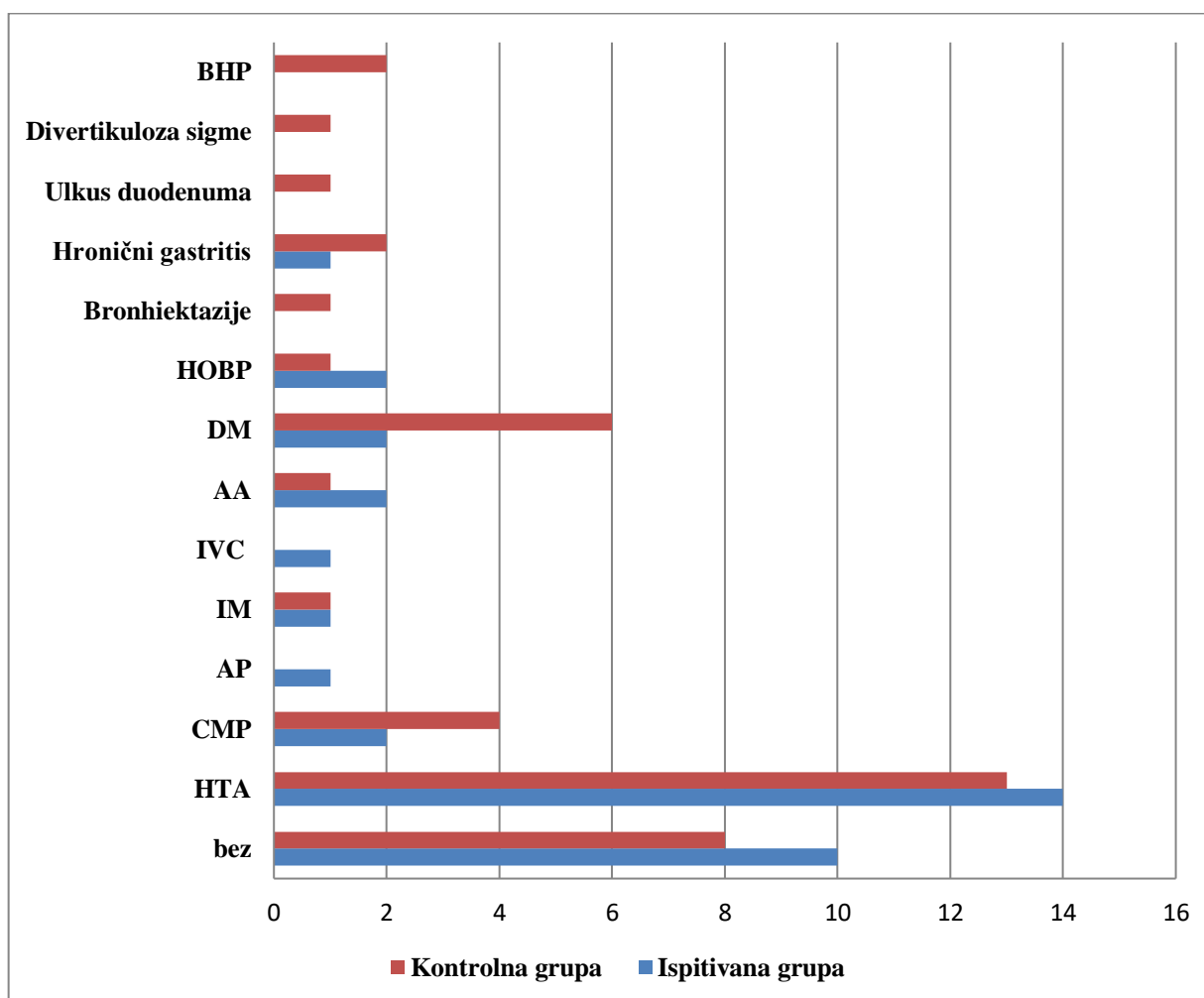
U momentu dijagnoze, u ispitivanoj grupi 93% ispitanika je imalo performans status ECOG  $\leq 1$ , dok je tu vrednost performans statusa u kontrolnoj grupi imao manji procenat ispitanika, njih 67% (grafikon 7). U odnosu na ECOG performans status postoji statistički značajna razlika između dve grupe, odnosno značajno veći broj ispitanika je imao ECOG  $\geq 2$  u kontrolnoj grupi, a u ispitivanoj ECOG  $\leq 1$  ( $\chi^2(1) = 8,46, p < 0,01$ ).

**Grafikon 7.** Distribucija ispitanika u odnosu na ECOG performans status



U odnosu na prisustvo komorbiditeta, najviše ispitanika u našem istraživanju je imalo povišen krvni pritisak, ukupno 27 ispitanika (45%), 8 ispitanika, odnosno 13,3%, je imalo šećernu bolest. Jedan ispitanik je imao demenciju, epilepsiju i glaukom. Bez komorbiditeta je bilo 18 ispitanika, 10 ispitanika ispitivane grupe, odnosno 8 ispitanika kontrolne grupe (grafikon 8).

**Grafikon 8.** Komorbiditeti ispitanika



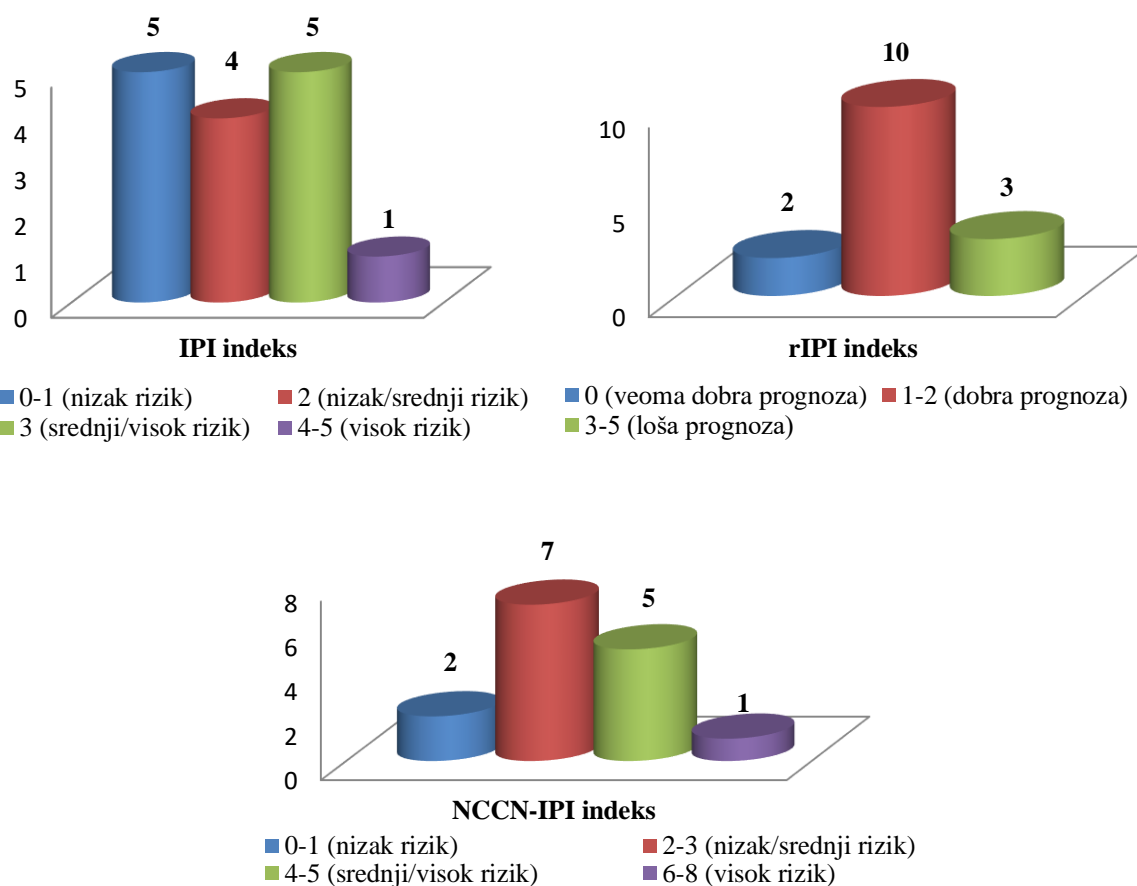
BHP – benigna hiperplazija prostate, HOBP – hronična opstruktivna bolest pluća, DM – šećerna bolest, AA – absolutna artimija, IVC – cerebrovaskularni inzult, IM – infarkt miokarda, AP – angina pektoris, CMP – hronična kardiomiopatija, HTA – arterijska hipertenzija

## 2.4. Prognozni indeksi

### 2.4.1. Difuzni B krupnoćelijski limfom (15 ispitanika)

Prema IPI indeksu, 33,3% ispitanika sa DBKL-om je pripadalo grupi niskog rizika, odnosno srednje visokom riziku. Nešto manje ispitanika je bilo u grupi srednje niskog rizika, dok je samo jedan ispitanik bio u grupi visokog rizika. Lošu prognozu prema revidiranom IPI indeksu je imalo troje ispitanika (20%), dobru 10 ispitanika (66,6%), odnosno veoma dobru dvoje ispitanika. Visok rizik prema NCCN-IPI indeksu je imao jedan ispitanik sa difuznim B krupnoćelijskim limfomom. Najveći broj ispitanika (46,6%) prema ovom indeksu imao je nizak srednji rizik za lošiji ishod lečenja.

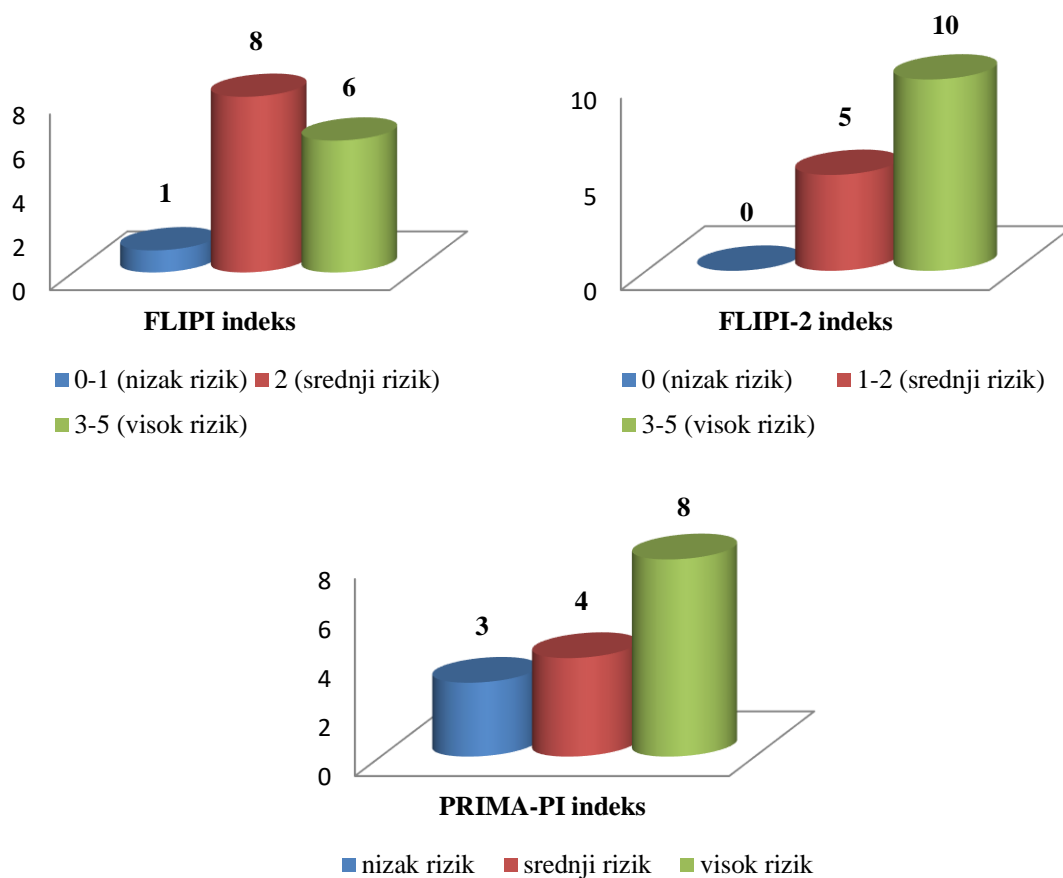
**Grafikon 9.** Distribucija ispitanika sa difuznim B krupnoćelijskim limfomom u odnosu na prognoze skorove (IPI, rIPI i NCCN-IPI indeks)



#### 2.4.2. Folikularni limfom (15 ispitanika)

U odnosu na FLIPI indeks više od polovine ispitanika sa folikularnim limfomom je pripadalo grupi srednjeg rizika (53,3%), a nešto manje grupi visokog rizika (40%). Prema FLIPI-2 indeksu najviše ispitanika je bilo raspoređeno u grupu visokog rizika (66,6%), odnosno grupu srednjeg rizika (33,3%). Osam ispitanika, prema PRIMA-PI indeksu je pripadalo grupi visokog rizika, dok je troje ispitanika imalo nizak rizik za progresiju prema ovom indeksu.

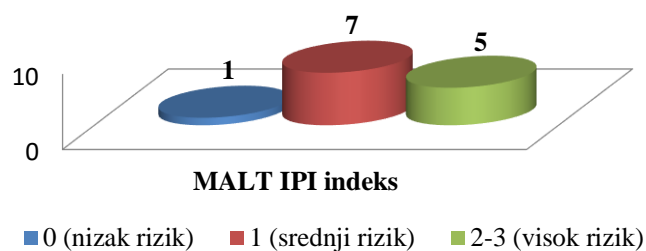
**Grafikon 10.** Distribucija ispitanika sa folikularnim limfomom u odnosu na prognoze skorove (FLIPI, FLIPI-2 i PRIMA PI indeks)



### 2.4.3 Limfom marginalne zone (13 ispitanika)

Prema MALT IPI indeksu najviše ispitanika je bilo u grupi srednjeg rizika (53,8%), nešto manje u grupi visokog rizika (38,4%), dok je samo jedan ispitanik sa limfomom marginalne zone pripadao grupi niskog rizika.

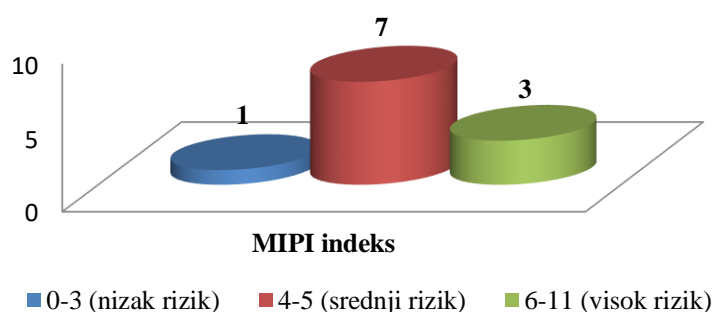
**Grafikon 11.** Distribucija ispitanika sa limfomom marginalne zone u odnosu na MALT IPI prognozni indeks



#### 2.4.4 Mantle ćelijski limfom (11 ispitanika)

Od 11 ispitanika sa mantle ćelijskim limfomom, 63,6% ispitanika pripadalo je grupi srednjeg rizika. Troje ispitanika (27,2%) bilo je u grupi visokog rizika. Jedan ispitanik prema MIPI indeksu je imao nizak rizik za lošu prognozu.

**Grafikon 12.** Distribucija ispitanika sa mantle ćelijskim limfomom u odnosu na MIPI prognozni indeks



MIPI c prognozni indeks nije bilo moguće izračunati za sve ispitanike s obzirom na to da vrednost (%) proliferativnog indeksa Ki-67 nije bio dostupan za sve ispitanike sa mantle ćelijskim limfom. Svi ispitanici sa *Waldenstromovom* makroglobulinemijom, njih troje, pripadalo je grupu visokog rizika prema ISSWM indeksu.

#### 2.5. Terapija i odgovor na terapiju

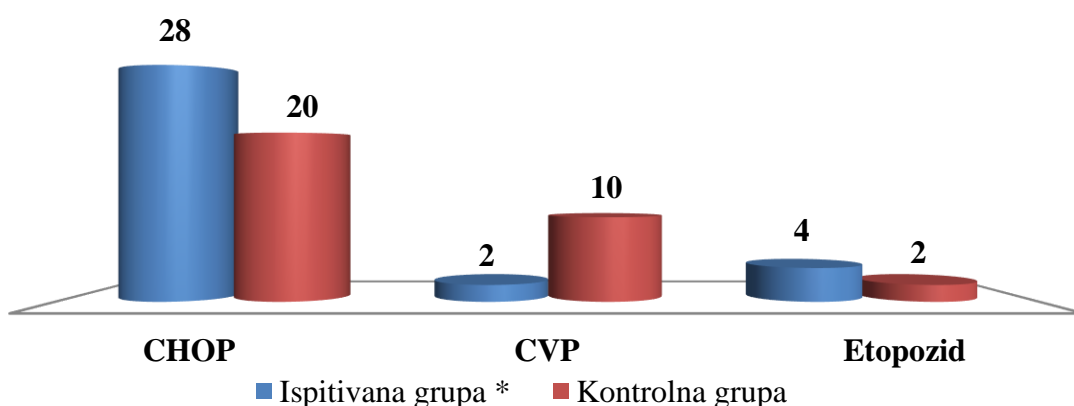
U ispitivanoj grupi, 28 ispitanika (93,3%) lečeno je kombinacijom ciklofosfamida, doksorubicina, vinkristina i prednizona uz anti-CD20 monoklonsko antitelo svake tri nedelje (R-CHOP 21). Četiri ispitanika (13,3%) su uz ovu kombinaciju dobila i etopozid (R-CHOEP 21). Dva ispitanika (6,66%) su lečena prema R-CVP protokolu (grafikon 8). U ovoj grupi ispitanika, 7 (23,3%) je primilo ukupno 6 ciklusa, dok je 23 ispitanika (76,6%) primilo 8 ciklusa hemioterapije.

U kontrolnoj grupi, 20 ispitanika (66,6%) je lečeno prema CHOP 21 protokolu. Dva ispitanika su uz ovu kombinaciju dobila i etopozid (6,66%). 10 ispitanika (33,3%) je lečeno

prema CVP protokolu. Šest ciklusa hemioterapije je primilo 18 ispitanika (60%), dok je 12 ispitanika primilo 8 ciklusa (40%) (grafikon 13).

Postoji statistički značajna razlika u broju primljenih hemioterapijskih protokola između grupa ( $\chi^2 = 10.00$ ,  $p = 0,001$ ). U ispitivanoj grupi je značajno više ispitanika primilo 8 hemioterapijskih protokola, dok je u kontrolnoj grupi značajno veći broj ispitanika primio 6 hemioterapijskih protokola.

**Grafikon 13.** Distribucija ispitanika u odnosu na vrstu primenjenog hemioterapijskog protokola



CHOP - ciklofosfamid, doksorubicin, vinkristin, prednizon. CVP - ciklofosfamid, vinkristin, prednizon

\* Svi ispitanici ispitivane grupe su uz prikazane hemioterapijske protokole primili i antiCD-20 monoklonsko antitelo (rituksimab)

Ispitivana grupa primila je, tokom lečenja, u proseku 2588,17 mg prednizona po kvadratu telesne površine ispitanika (1657-4615), dok je kontrolna grupa primila značajno manju dozu, 2029,33 mg (1131-3322). Ovaj podatak je bio očekivan, s obzirom na to da je ispitivana grupa primala anti-CD20 antitelo koje zahteva primenu kortikosteroidne premedikacije. Postoji statistički značajna razlika u količini prednizona koju je primila ispitivana grupa u odnosu na kontrolnu ( $t = -4,32$ ,  $p < 0,01$ ).

S obzirom na postojanje značajnih razlika u odnosu na dozu primljenog prednizona kod ispitivane i kontrolne grupe, sve varijable koje su korišćene u daljim analizama istraživanja (a koje se odnose na vrednosti nakon terapije) su standardizovane kako bi se svele na isti nivo merenja, a zatim su korigovane putem standardne procedure parcijalizacije (odnosno odstranjivanja varijanse) za različite doze prednizona. Na taj način su efekti

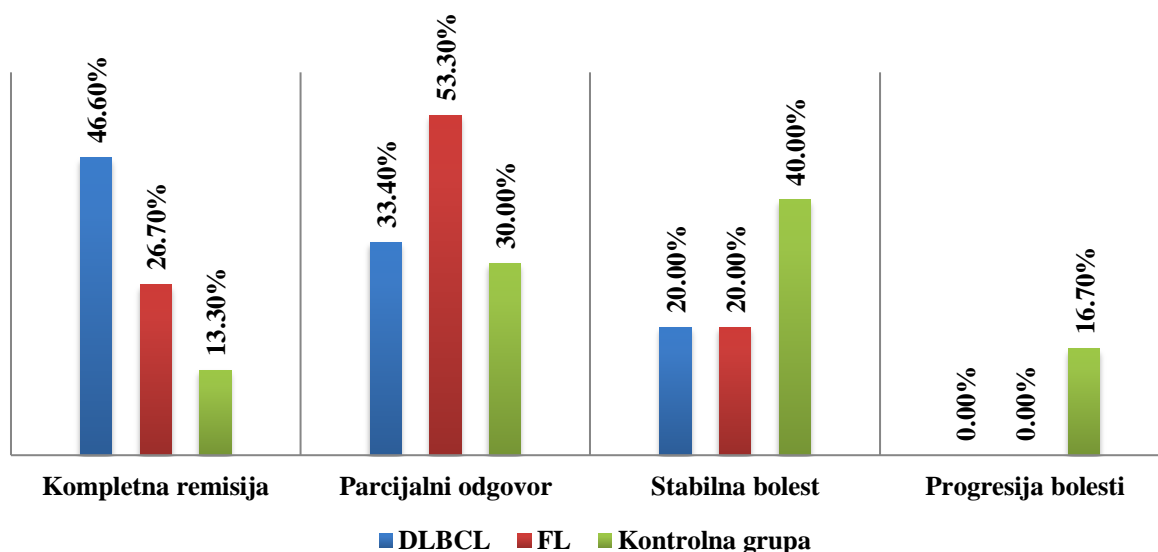
različitih doza prednizona, koje su ispitanici primali svedeni na konstantne, čime je obezbeđeno adekvatno statističko zaključavanje u kontekstu navedenih hipoteza istraživanja.

Nakon završenog lečenja kod svakog ispitanika procenjivan je odgovor na primenjenu terapiju (grafikon 14). U ispitivanoj grupi kompletnu remisiju (CR) je postiglo 11 (36,6%) ispitanika, parcijalnu (PR) 13 (43,3%), dok je stabilna bolest verifikovana kod 6 (20%) ispitanika. Kompletni terapijski odgovor je postignut kod 7 ispitanika sa DBKL-om (46,6%) i 4 ispitanika sa FL-om (26,7%). Parcijalan terapijski odgovor je postignut kod 5 ispitanika (33,4%) sa DBKL-om, odnosno 8 ispitanika sa FL-om (53,3%). Ukupan odgovor na primenjenu lečenje (eng. *ORR – overall response rate*) (CR+PR) postignut je u 80% slučajeva.

U kontrolnoj grupi kompletnu remisiju je postiglo 4 (13,3%) ispitanika, parcijalnu remisiju 9 (30%), dok je stabilna bolest potvrđena kod 12 (40%) ispitanika. Bolest je progredirala (PD) kod 5 (16,6%) ispitanika. Kompletnu remisiju je postiglo dvoje ispitanika sa MCL-om (6,66%), odnosno dva ispitanika sa MZL-om (6,66%). Parcijalan odgovor je postiglo četvoro ispitanika sa MZL-om (13,3%), 3 ispitanika sa MCL-om (10%) i jedan ispitanik sa limfomom malih limfocita (3,33%). Ukupan odgovor na primenjenu lečenje (ORR) (CR+PR) postignut je u 43,3% slučajeva.

Ustanovljena je statistički značajna razlika u postizanju terapijskog odgovora između dve grupe ispitanika ( $\chi^2(3) = 8,53, p < 0,01$ ).

**Grafikon 14.** Distribucija ispitanika prema terapijskom odgovoru





### 3. LABORATORIJSKI PARAMETRI

#### 3.1 Parametri krvne slike ispitanika i biohemijskih markera aktivnosti bolesti

Broj leukocita je bio statistički značajno niži nakon terapije u ispitivanoj grupi ( $p = 0,04$ ). Drugi parametri krvne slike i biohemijskih markera aktivnosti bolesti nisu bili statistički značajno promenjeni nakon lečenja u ovoj grupi ispitanika. Pad vrednosti CRP-a nakon terapije imao je marginalnu statističku značajnost ( $p = 0,08$ ). Posterapijske vrednosti drugih biohemijskih markera aktivnosti bolesti, vrednosti brzine sedimentacije, laktat dehidrogenaze, beta 2 mikroglobulina i feritina, su bile niže nakon terapije, dok je, sa druge strane, došlo do porasta fibrinogena i albumina (tabela 7). Navedene promene nisu bile statistički značajne.

**Tabela 7.** Parametri krvne slike ispitanika i biohemijskih markera aktivnosti bolesti - Ispitivana grupa

	Pre terapije				Posle terapije				Statistička značajnost (p)
	$\bar{x}$	SD	Min	Max	$\bar{x}$	SD	Min	Max	
<b>Leukociti (<math>\times 10^9/l</math>)</b>	6,86	3,83	1,90	18,60	5,27	2,12	2,70	12,50	<b>0,04</b>
<b>Limfociti - apsolutni broj (<math>\times 10^9/l</math>)</b>	1,89	1,75	0,27	8,38	1,47	0,82	0,08	3,46	0,14
<b>Hemoglobin (g/l)</b>	128,86	18,14	97,00	162,00	128,46	14,49	107,00	166,00	0,90
<b>Trombociti (<math>\times 10^9/l</math>)</b>	246,67	115,25	81,00	543,00	235,30	95,60	113,00	518,00	0,56
<b>Sedimentacija (mm u 1. satu)</b>	20,40	21,76	1,00	85,00	14,27	18,71	3	107	0,24
<b>C reaktivni protein (CRP) (mg/l)</b>	16,26	23,57	0,10	90,20	6,69	14,57	0,10	73,10	0,08
<b>Fibrinogen (g/l)</b>	3,47	1,04	2,20	6,02	3,50	0,71	2,40	4,87	0,33
<b>Beta 2 mikroglobulin (mg/l)</b>	3,09	1,16	1,60	5,91	2,22	5,46	1,27	4,06	0,57
<b>Laktat dehidrogenaza (LDH) (U/l)</b>	249,87	152,15	75,00	780,00	215,97	89,81	2,38	467,00	0,30
<b>Albumini (g/l)</b>	40,22	9,63	24,32	51,68	45,13	12,31	31,86	50,48	0,22
<b>Feritin (<math>\mu g/l</math>)</b>	224,18	202,52	17,80	671,20	147,16	181,69	7,60	966,60	0,11

Parametri krvne slike ispitanika i biohemijskih markera aktivnosti bolesti ispitanika kontrolne grupe prikazani su u tabeli 8. Analiziranjem navedenih parametara utvrđen je statistički značajan porast vrednosti hemoglobina ( $p = 0,01$ ), nakon terapije, kao i značajan pad limfocita ( $p = 0,03$ ), brzine sedimentacije ( $p = 0,01$ ) i beta 2 mikroglobulina ( $p = 0,00$ ). Potencijalna statistička značajnost postojala je kod pada vrednosti leukocita ( $p = 0,06$ ) i porasta fibrinogena nakon terapije ( $p = 0,09$ ). Postterapijski je došlo do porasta trombocita, albumina i feritina, dok su vrednosti CRP i LDH bile niže. Navedene promene nisu bile statistički značajne.

**Tabela 8.** Parametri krvne slike ispitanika i biohemijskih markera aktivnosti bolesti - Kontrolna grupa

	Pre terapije				Posle terapije				Statistička značajnost (p)
	$\bar{x}$	SD	Min	Max	$\bar{x}$	SD	Min	Max	
<b>Leukociti</b> ( $\times 10^9/l$ )	20,01	21,98	3,78	92,82	13,05	24,94	2,5	126,33	0,06
<b>Limfociti -</b> <b>apsolutni broj</b> ( $\times 10^9/l$ )	13,45	19,56	0,34	78,29	6,46	20,32	0,33	110,22	<b>0,03</b>
<b>Hemoglobin</b> (g/l)	107,70	28,59	58,00	160,00	119,40	19,45	73,00	159,00	<b>0,01</b>
<b>Trombociti</b> ( $\times 10^9/l$ )	171,37	99,37	28,00	515,00	194,83	107,78	16,00	460,00	0,15
<b>Sedimentacija</b> (mm u 1. satu)	46,30	36,39	4,00	125,00	33,47	34,73	3	150	<b>0,01</b>
<b>C reaktivni</b> <b>protein (CRP)</b> (mg/l)	19,43	25,87	0,10	94,10	14,55	25,73	0,20	119,30	0,46
<b>Fibrinogen (g/l)</b>	3,41	1,29	1,95	8,58	3,84	1,15	2,18	6,74	0,09
<b>Beta 2</b> <b>mikroglobulin</b> (mg/l)	5,30	3,59	1,74	15,99	3,40	1,60	1,39	8,03	<b>0,00</b>
<b>Laktat</b> <b>dehidrogenaza</b> (LDH) (U/l)	224,07	88,48	117,00	503,00	212,43	43,92	120,00	322,00	0,50
<b>Albumini (g/l)</b>	42,12	5,59	31,05	55,00	44,44	4,77	33,81	55,90	0,12
<b>Feritin (<math>\mu g/l</math>)</b>	170,07	171,65	9,40	700,40	280,08	417,27	12,00	1897,00	0,12

### 3.2 Laboratorijski parametri koštanog metabolizma

Parametri koštanog metabolizma ispitivane grupe pre i nakon završenog lečenja jedino pokazuju statistički značajnu razliku u odnosu na porast vrednosti vrednosti P1NP-a ( $p = 0,00$ ) (tabela 9).

**Tabela 9.** Laboratorijski parametri koštanog metabolizma - Ispitivana grupa

	Pre terapije				Posle terapije				Statistička značajnost (p)
	$\bar{x}$	SD	Min	Max	$\bar{x}$	SD	Min	Max	
<b>Ca jonizovani (mmol/l)</b>	1,17	0,23	1,00	2,29	1,15	0,20	1,03	1,29	0,89
<b>Mg (mmol/l)</b>	0,83	0,08	0,68	1,01	0,81	0,10	0,65	1,19	0,36
<b>P (mmol/l)</b>	1,06	0,15	0,76	1,40	1,17	0,17	0,73	1,46	0,10
<b>Vitamin D (nmol/l)</b>	39,66	21,08	14,00	84,00	32,97	15,57	14,90	75,20	0,07
<b>ALP (U/l)</b>	238,53	565,48	28,00	3203,00	161,63	58,50	57,00	312,00	0,46
<b>Cross Laps (pg/ml)</b>	635,97	426,30	73,00	2045,00	831,57	380,25	207,00	1804,00	0,06
<b>P1NP (ng/ml)</b>	51,67	30,36	8,70	118,30	136,00	83,01	29,90	408,00	<b>0,00</b>
<b>RANKL (pg/ml)</b>	155,1	41,09	95,00	260,00	161,6	51,61	105,00	264,00	0,21
<b>OPG (pg/ml)</b>	1887,40	938,64	142,00	4400,00	1804,33	775,38	150,00	4000,00	0,48
<b>RANKL/OPG Odnos</b>	0,082	0,31	0,04	1,73	0,089	0,31	0,05	1,73	0,96

Utvrđena je statistički značajna razlika u promeni vrednosti analiziranih parametara koštanog metabolizma kontrolne grupe posle terapije, u odnosu na ispitivane vrednosti pre tretmana, i to u odnosu na značajni porast vrednosti P1NP-a ( $p = 0,00$ ). Podaci su prikazani u tabeli 10.

**Tabela 10.** Laboratorijski parametri koštanog metabolizma - Kontrolna grupa

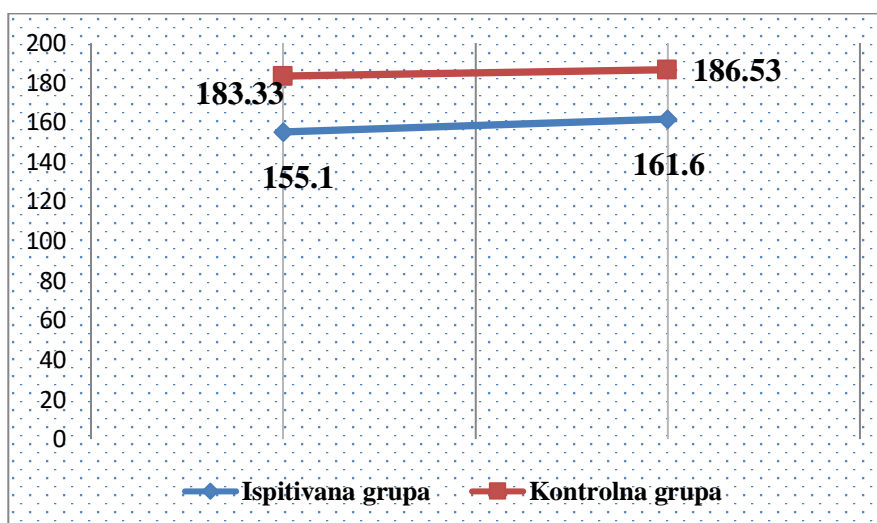
	Pre terapije				Posle terapije				Statistička značajnost (p)
	$\bar{x}$	SD	Min	Max	$\bar{x}$	SD	Min	Max	
<b>Ca jonizovani (mmol/l)</b>	1,13	0,06	1,00	1,27	1,16	0,07	1,01	1,28	0,11
<b>Mg (mmol/l)</b>	1,95	6,18	0,66	3,47	0,79	0,06	0,68	0,96	0,31
<b>P (mmol/l)</b>	1,18	0,17	0,85	1,80	1,12	0,17	0,73	1,46	0,09
<b>Vitamin D (nmol/l)</b>	41,21	20,44	7,70	87,00	41,28	21,32	17,00	99,00	0,98
<b>ALP (U/l)</b>	179,06	158,90	43,00	921,00	161,81	80,71	22,30	418,00	0,52
<b>Cross Laps (pg/ml)</b>	560,43	269,57	137,00	1318,00	621,37	254,66	215,00	1054,00	0,20
<b>PINP (ng/ml)</b>	44,89	23,57	9,20	118,10	79,80	35,62	12,30	135,30	<b>0,00</b>
<b>RANKL (pg/ml)</b>	183,33	45,20	120,00	266,00	186,53	50,42	128,00	320,00	0,58
<b>OPG (pg/ml)</b>	2234,66	735,12	800,00	3400,00	2366,67	843,32	840,00	3600,00	0,09
<b>RANKL/OPG Odnos</b>	0,10	0,06	0,04	0,25	0,10	0,06	0,04	0,22	0,54

Vrednost koštanog biohemijskog markera RANKL, u ispitivanoj grupi, statistički se značajno ne razlikuje pre i nakon terapije ( $t = 0,51$ ,  $df = 58$ ,  $p = 0,60$ ). Prosečna vrednost pre terapije iznosila je  $155,1 \pm 41,09$ , dok je nakon terapije došlo do povećanja vrednosti RANKL-a na  $161,60 \pm 51,361$ , odnosno vrednost RANKL-a je porasla za 4,1%.

Takođe, nije potvrđena statistička značajnost u promeni vrednosti RANKL-a pre i posle terapije ni u kontrolnoj grupi ( $t = 0,26$ ,  $df = 58$ ,  $p = 0,80$ ). Kontrolna grupa ispitanika imala je više vrednosti RANKL u odnosu na ispitivanu grupu, kako pre ( $183,33 \pm 45,20$ ), tako i posle terapije ( $186,53 \pm 50,42$ ). U kontrolnoj grupi ispitanika takođe je došlo do porasta vrednosti RANKL-a nakon terapije, za 1,7% vrednosti.

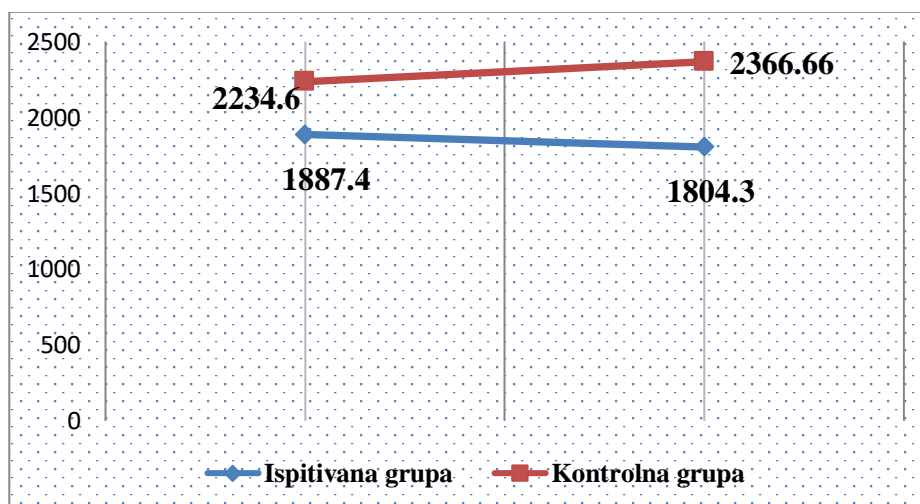
Postoji statistički značajna razlika između vrednosti RANKL-a pre ( $t = -2,51$ ,  $p < 0,05$ ) i posle ( $t = -1,99$ ,  $p < 0,05$ ) terapije između ispitivanih grupa, grupa, odnosno veće vrednosti pre i nakon terapije su zabeležene u kontrolnoj grupi ispitanika.

**Grafikon 15.** Razlika u prosečnim vrednostima RANKL-a pre i nakon terapije



Vrednost koštanog biohemijskog markera OPG-a statistički se značajno ne razlikuje pre i nakon terapije u ispitivanoj ( $t = 0,38$ ,  $df = 58$ ,  $p = 0,71$ ) ni u kontrolnoj ( $t = 0,64$ ,  $df = 58$ ,  $p = 0,32$ ) grupi. Prosečna vrednost OPG-a pre terapije u ispitivanoj grupi iznosila je  $1887,40 \pm 938,64$ , dok je nakon terapije došlo do njegovog smanjenja na vrednost od  $1804,33 \pm 775,38$  (4,4%). U kontrolnoj grupi, i pre i posle terapije izmerene su veće vrednosti OPG u odnosu na ispitivanu grupu. Pre terapije prosečna vrednost OPG-a iznosila je  $2234,66 \pm 735,12$ , dok je nakon terapije, došlo do povećanja vrednosti OPG-a za 5,9%, odnosno na  $2366,67 \pm 843,32$ .

**Grafikon 16.** Razlika u prosečnim vrednostima OPG-a pre i nakon terapije



P1NP je jedina koštana varijabla čiji je stepen promene, nakon terapije, statistički značajan. U kontrolnoj grupi je došlo do statistički značajno manjeg porasta P1NP-a u odnosu na ispitivanu grupu ( $p = 0,01$ ). Na ostalim varijablama nisu dobijene statistički značajne razlike kada se govori o stepenu promene koštanih biohemijskih markera, RANKL-a i OPG-a (tabela 11).

**Tabela 11.** Komparacija promene nivoa koštanih biohemijskih markera, RANKL-a i OPG-a kod ispitivane i kontrolne grupe

	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>Mc</i>	<i>SDc</i>	<i>M-W-U</i>	<i>P</i>
<b><math>\Delta</math>RANKL</b>	6,43	27,74	3,20	32,08	446,50	0,84
<b><math>\Delta</math>OPG</b>	-86,07	634,26	132,00	407,40	334,50	0,09
<b><math>\Delta</math>ALP</b>	-76,90	564,63	-17,23	147,50	355,00	0,16
<b><math>\Delta</math>CrossLaps</b>	195,60	542,60	60,93	259,11	367,00	0,22
<b><math>\Delta</math>P1NP</b>	84,33	79,42	34,90	38,11	367,00	<b>0,01</b>

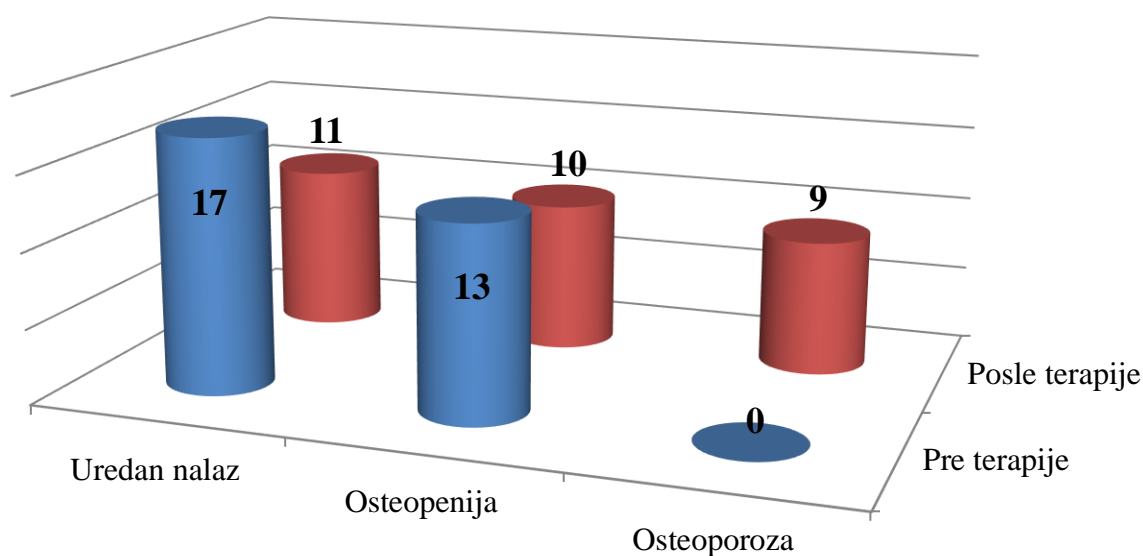
#### 4. OSTEODENZITOMETRIJSKI REZULTATI

Svi ispitanici uključeni u istraživanje nisu primali bisfosfonate, kao ni supstitucionu terapiju vitaminom D, odnosno kalcijumom. Tokom perioda istraživanja nije zabeležena pojava patoloških fraktura, ni u ispitivanoj ni u kontrolnoj grupi.

U ukupnom uzorku ispitanika, prilikom postavljanja dijagnoze NHL-a 37 ispitanika (61,6%) imalo je osteodenzitometrijski nalaz u referentnim opsezima. Osteopenija je detektovana kod 23 ispitanika (38,3%), dok osteoporoza nije dijagnostikovana ni kod jednog ispitanika.

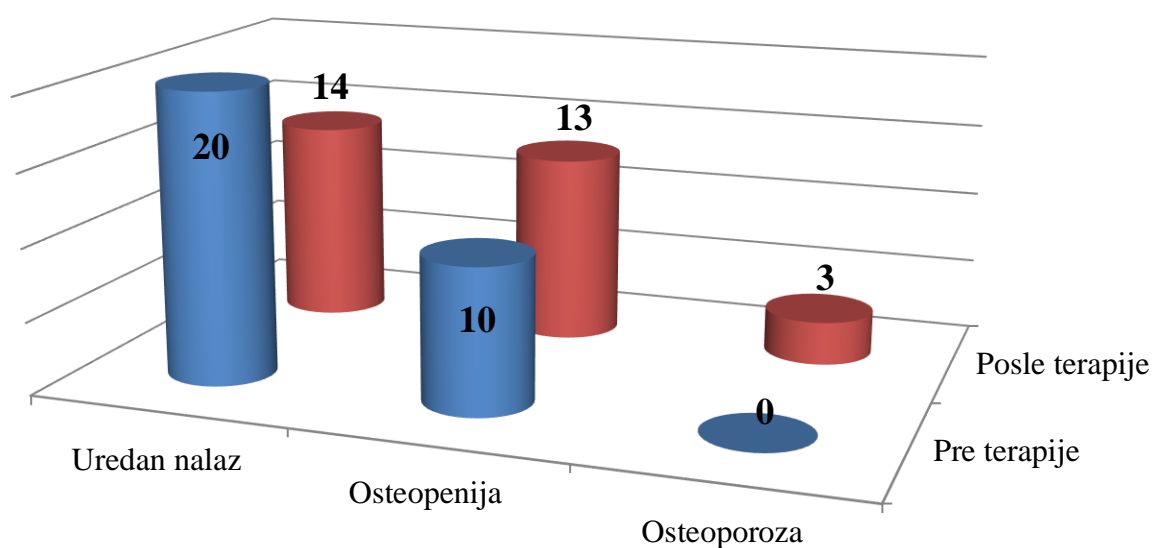
Nakon terapije u ispitivanoj grupi, 11 od 17 ispitanika nije imalo promena u osteodenzitometrijskom nalazu (36,6%), kod 10 je postojala osteopenija (33,3%), dok je kod 9 ispitanika (30%), T skor bio niži od -2,5 SD, te je postavljena dijagnoza osteoporoze. Osteoporoza je dijagnostikovana kod 6 pripadnica ženskog pola (26,1% od ukupnog broja žena uključenih u istraživanje), odnosno kod 3 muškarca (8,1% od ukupnog broja muškaraca). Svi ispitanici koji su razvili postterapijsku osteoporozu su inicijalno imali osteopeniju (grafikon 17). Inicijalno je u ispitivanoj grupi osteopeniju imalo 7 ispitanika sa DBKL-om, odnosno 6 ispitanika sa FL-om. Nakon terapije, osteoporoza je dijagnostikovana kod 5 ispitanika sa DBKL-om, odnosno kod 4 ispitanika sa FL-om. Postterapijska osteopenija je verifikovana kod 5 ispitanika sa DBKL-om, odnosno kod 5 ispitanika sa FL-om.

**Grafikon 17.** Nalaz osteodenzitometrije ispitivane grupe pre i nakon terapije



U kontrolnoj grupi, nakon terapije, 46,6% ispitanika (14/30) je imalo uredan nalaz osteodenzitometrije (grafikon 18). Osteopenija je postojala kod 43,3% ispitanika (13/30). Više ispitanika je imalo osteopeniju nakon terapije nego na početku lečenja (10/30 ispitanika, 33,3%). Osteoporozu je razvilo troje ispitanika (10%), dve žene (8,7% od ukupnog broja žena) i jedan muškarac (2,7% od ukupnog broja muškaraca), od kojih je dvoje imalo uredan osteodenzitometrijski nalaz na početku lečenja, a jedan ispitanik je imao osteopeniju.

**Grafikon 18.** Nalaz osteodenzitometrije kontrolne grupe, pre i nakon terapije



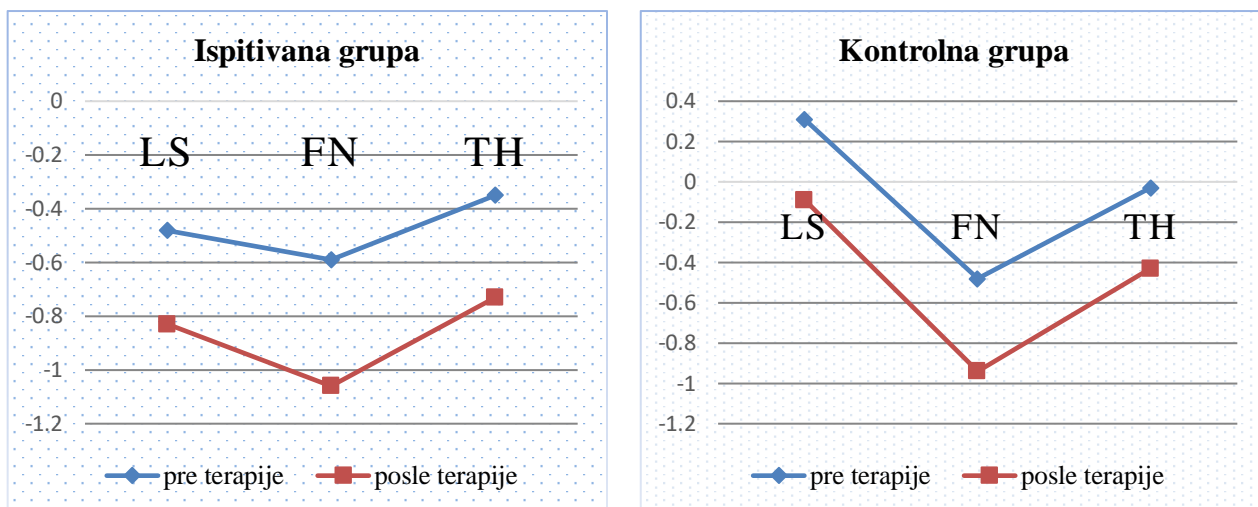
Nakon terapije, ukupno 20% (12/60) ispitanika je imalo osteoporozu, 8 žena (34,7% od ukupnog broja žena) i 4 muškarca (10,8% od ukupnog broja muškaraca).

Postoji statistički značajna razlika, između ispitivanih grupa, u broju ispitanika kod kojih je dijagnostikovana osteoporozu nakon lečenja ( $h_i = 8,06$ ,  $p < 0,05$ ), odnosno veći broj ispitanika u ispitivanoj grupi je imalo dijagnostikovanu osteoporozu u odnosu na kontrolnu grupu.

U ispitivanoj grupi, prosečna vrednost T skora svih merenih polja, je bila niža, kako pre (T skor LS -0,48, FN -0,59, TH -0,35), tako i posle terapije (T skor LS -0,83, FN -1,06, TH -0,73), u odnosu na prosečnu vrednost T skora u kontrolnoj grupi kako pre (T skor LS 0,31, FN -0,48, TH 0,03) ali i posle terapije (T skor LS -0,09, FN -0,94, TH -0,43).



**Grafikon 19.** Nalaz osteodenzitometrije (T skora) ispitivane i kontrolne grupe, pre i nakon terapije



LS – Lumbal spine (lumbalna kičma), FN – femoral neck (vrat butne kosti), TH –total hip (kuk)

Uvidom u rezultate *Wilcoxonovog* testa, odnosno testa za zavisne uzorke, statistički je dokazano da postoji značajno smanjenje koštane gustine nakon završenog lečenja kod svih ispitanika.

**Tabela 12.** Komparacija osteodenzitometrijskih parametara (BMD i T skora) pre i posle lečenja – ukupan uzorak

	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>Z</i>	<i>P</i>
Lumbal Spine BMD (pre)	1,18	0,21		
Lumbal Spine BMD (posle)	1,14	0,21	-4,13	<b>0,01</b>
Lumbal Spine BMD – T (pre)	-0,08	1,60		
Lumbal Spine BMD – T (posle)	-0,46	1,72	-5,03	<b>0,00</b>
Femoral Neck BMD (pre)	0,95	0,16		
Femoral Neck BMD (posle)	0,91	0,17	-4,32	<b>0,00</b>
Femoral Neck BMD - T (pre)	-0,53	1,16		
Femoral Neck BMD - T (posle)	-1,00	1,29	-4,77	<b>0,00</b>
Total Hip BMD (pre)	1,02	0,18		
Total Hip BMD (posle)	0,98	0,20	-5,57	<b>0,00</b>
Total Hip BMD - T (pre)	-0,19	1,27		
Total Hip BMD - T (posle)	-0,58	1,44	-5,67	<b>0,00</b>

**Tabela 13.** Komparacija osteodenzitometrijskih parametara (BMD i T skora) pre i posle lečenja – Ispitivana grupa

	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>Z</i>	<i>P</i>
Lumbal Spine BMD (pre)	1,12	0,21	-3,26	<b>0,00</b>
Lumbal Spine BMD (posle)	1,09	0,22		
Lumbal Spine BMD – T (pre)	-0,48	1,56	-3,58	<b>0,00</b>
Lumbal Spine BMD – T (posle)	-0,83	1,77		
Femoral Neck BMD (pre)	0,93	0,17	-2,89	<b>0,00</b>
Femoral Neck BMD (posle)	0,89	0,19		
Femoral Neck BMD - T (pre)	-0,59	1,30	-3,36	<b>0,00</b>
Femoral Neck BMD - T (posle)	-1,06	1,47		
Total Hip BMD (pre)	1,00	0,19	-3,83	<b>0,00</b>
Total Hip BMD (posle)	0,96	0,21		
Total Hip BMD - T (pre)	-0,35	1,31	-4,09	<b>0,00</b>
Total Hip BMD - T (posle)	-0,73	1,55		

**Tabela 14.** Komparacija osteodenzitometrijskih parametara (BMD i T skora) pre i posle lečenja – kontrolna grupa

	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>Z</i>	<i>P</i>
Lumbal Spine BMD (pre)	1,24	0,19	-2,68	<b>0,00</b>
Lumbal Spine BMD (posle)	1,20	0,20		
Lumbal Spine BMD – T (pre)	0,31	1,57	-3,56	<b>0,00</b>
Lumbal Spine BMD – T (posle)	-0,09	1,62		
Femoral Neck BMD (pre)	0,97	0,15	-3,22	<b>0,00</b>
Femoral Neck BMD (posle)	0,92	0,15		
Femoral Neck BMD - T (pre)	-0,48	1,02	-3,43	<b>0,00</b>
Femoral Neck BMD - T (posle)	-0,94	1,11		
Total Hip BMD (pre)	1,05	0,17	-3,92	<b>0,00</b>
Total Hip BMD (posle)	1,00	0,18		
Total Hip BMD - T (pre)	-0,03	1,23	-3,84	<b>0,00</b>
Total Hip BMD - T (posle)	-0,43	1,33		

Uvidom u rezultate *Man-Witney-U* testa, može se ustanoviti da postoje marginalne razlike između kontrolne i ispitivane grupe u pogledu koštane gustine, nakon terapije, na nivou lumbalne kičme ( $p=0,07$ ;  $p=0,08$ ). Ispitanici koji primaju monoklonsko anti-CD20 antitelo imaju nešto niži indeks koštane gustine na nivou lumbalne kičme u odnosu na ispitanike kontrolne grupe (tabela 15).

**Tabela 15.** Komparacija osteodenzitometrijskih parametara (BMD i T skora) kod ispitivane i kontrolne grupe - nakon terapije

	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>Mc</i>	<i>SDc</i>	<i>M-W-U</i>	<i>P</i>
Lumbal Spine BMD	1,09	0,22	1,20	0,20	325,50	0,07 <sup>+</sup>
Lumbal Spine BMD – T	-0,83	1,77	-0,09	1,62	331,00	0,08 <sup>+</sup>
Femoral Neck BMD	0,89	0,19	0,92	0,15	436,00	0,84
Femoral Neck BMD - T	-1,06	1,47	-0,94	1,11	425,00	0,71
Total Hip BMD	0,96	0,21	1,00	0,18	413,00	0,58
Total Hip BMD - T	-0,73	1,55	-0,43	1,33	407,00	0,53

Ne postoji statistički značajna razlika u stepenu promena koštane gustine, nakon terapije između grupa, odnosno stepen promena koštane gustine nije značajno određen time da li je ispitanik primio anti-CD20 monoklonsko antitelo ili nije (tabela 16).

**Tabela 16.** Komparacija stepena promene osteodenzitometrijskih parametara (vrednosti BMD i T skora) kod ispitivane i kontrolne grupe

	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>Mc</i>	<i>SDc</i>	<i>M-W-U</i>	<i>P</i>
$\Delta$ Lumbal Spine BMD	0,03	0,08	0,04	0,11	445,00	0,94
$\Delta$ Lumbal Spine BMD – T	0,35	0,47	0,40	0,50	430,00	0,77
$\Delta$ Femoral Neck BMD	0,04	0,06	0,05	0,06	440,00	0,88
$\Delta$ Femoral Neck BMD - T	0,47	0,71	0,46	0,85	426,00	0,72
$\Delta$ Total Hip BMD	0,04	0,47	0,05	0,50	442,00	0,91
$\Delta$ Total Hip BMD - T	0,38	0,51	0,40	0,93	402,00	0,48

**Tabela 17.** Komparacija osteodenzitometrijskih parametara (BMD i T skora) nakon terapije između ispitanika sa difuznim B krupnoćelijskim limfom, folikularnim limfomom i ispitanika kontrolne grupe.

	<i>Mdif</i>	<i>SDdif</i>	<i>Mfolik</i>	<i>SDfolik</i>	<i>Mc</i>	<i>SDc</i>	<i>P</i>
Lumbal Spine BMD	1,07	0,22	1,12	0,23	1,20	0,20	0,18
Lumbal Spine BMD-T	-0,92	1,68	-0,74	1,91	-0,09	1,62	0,25
Femoral Neck BMD	0,88	0,21	0,92	0,19	0,92	0,15	0,73
Femoral Neck BMD-T	-1,17	1,67	-0,96	1,30	-0,94	1,11	0,85
Total Hip BMD	0,94	0,22	0,98	0,21	1,00	0,18	0,61
Total Hip BMD-T	-0,87	1,66	-0,59	1,49	-0,43	1,33	0,64

Nije postojala statistički značajna razlika prilikom komparacije osteodenzitometrijskih parametara (BMD i T skora) nakon terapije između ispitanika sa difuznim B-krupnoćelijskim limfom, folikularnim limfomom i ispitanika kontrolne grupe (tabela 17).

**Tabela 18.** Komparacija stepena promene osteodenzitometrijskih parametara (BMD i T skora) između ispitanika sa difuznim B krupnoćelijskim limfom, folikularnim limfomom i ispitanika kontrolne grupe.

	<i>Mdif</i>	<i>SDdif</i>	<i>Mfolik</i>	<i>SDfolik</i>	<i>Mc</i>	<i>SDc</i>	<i>P</i>
ΔLumbal Spine BMD	0,02	0,14	0,04	0,07	1,20	0,20	0,85
ΔLumbal Spine BMD-T	0,22	1,23	0,47	0,50	-0,09	1,62	0,65
ΔFemoral Neck BMD	0,03	0,07	0,05	0,06	0,92	0,15	0,84
ΔFemoral Neck BMD-T	0,29	0,61	0,66	1,03	-0,94	1,11	0,44
ΔTotal Hip BMD	0,03	0,08	0,05	0,04	1,00	0,18	0,61
ΔTotal Hip BMD-T	0,35	0,68	0,41	0,25	-0,43	1,33	0,92

Nije postojala statistički značajna razlika prilikom komparacije promene osteodenzitometrijskih parametara (BMD i T skora) između ispitanika sa difuznim B-krupnoćelijskim limfom, folikularnim limfomom i ispitanika kontrolne grupe (tabela 18).

**Tabela 19.** Uticaj vrste polihemioterapije na koštane biohemijske markere i T skor - ukupan uzorak ispitanika

	Protokol	$\bar{x}$	SD	p
<b>RANKL</b>	CVP	205,80	62,14	
	CHOP	176,90	41,93	<b>0,03</b>
	RCHOP	156,79	49,19	
<b>OPG</b>	CVP	1720,17	510,62	
	CHOP	2204,00	742,60	<b>0,05</b>
	RCHOP	2448,00	896,32	
<b>ALP</b>	CVP	1859,64	770,41	
	RCHOP	2121,90	841,60	0,62
	CHOP	179,60	86,38	
<b>CrossLaps</b>	CVP	152,92	78,48	
	CHOP	160,04	59,36	0,10
	RCHOP	160,95	70,60	
<b>P1NP</b>	CVP	603,20	287,56	
	CHOP	630,45	244,04	<b>0,00</b>
	RCHOP	832,00	393,32	
<b>LS</b>	CVP	723,05	342,85	
	CHOP	84,83	39,88	0,27
	RCHOP	77,29	34,11	
<b>FN</b>	CVP	139,31	84,42	
	CHOP	108,53	70,15	0,46
	RCHOP	-0,26	1,51	
<b>TH</b>	CVP	-0,01	1,71	
	CHOP	-0,81	1,79	0,69
	RCHOP	-0,44	1,73	

Postoje statistički značajne razlike u RANKL-u, OPG-u i P1NP-u. Ispitanici koji su primili CVP (10 ispitanika) imali su veće vrednosti RANKL-a u odnosu na ispitanike koji su lečeni prema RCHOP protokolu (28 ispitanika). Ispitanici koji su primili R-CHOP (20 ispitanika) imali su veće vrednosti OPG-a i P1NP-a od ispitanika lečenih CHOP-om. Ostale razlike nisu statistički značajne (tabela 19).

Takođe, nije bilo statistički značajne razlike u uticaju broja primljenih hemioterapijskih ciklusa (6/8) na koštane biohemijske markere i koštanu gustinu u ukupnom uzorku ispitanika. Više vrednosti RANKL-a, *CrossLaps*-a i OPG-a su bile u grupi ispitanika koja je primila 8 ciklusa hemioterapije, kod kojih su istovremeno verifikovane niže vrednosti P1NP-a i T skora (tabela 20).

**Tabela 20.** Uticaj broja primljenih ciklusa (6/8) na koštane biohemijske markere i T skor - ukupan uzorak ispitanika

	<b>Broj Ciklusa</b>	<b>Broj ispitanika</b>	$\bar{x}$	<b>SD</b>	<b>p</b>
<b>RANKL</b>	6	25	172,84	52,35	
	8	35	177,73	53,06	0,76
<b>OPG</b>	6	25	2067,33	888,74	
	8	35	2140,00	755,39	0,77
<b>ALP</b>	6	25	161,74	73,88	
	8	35	161,66	58,51	0,99
<b>CrossLaps</b>	6	25	683,46	360,31	
	8	35	740,80	265,55	0,57
<b>P1NP</b>	6	25	113,73	74,57	
	8	35	90,38	48,69	0,26
<b>LS</b>	6	25	-0,40	1,88	
	8	35	-0,64	1,12	0,64
<b>FN</b>	6	25	-0,98	1,29	
	8	35	-1,07	1,34	0,82
<b>TH</b>	6	25	-0,54	1,51	
	8	35	-0,69	1,24	0,73

## 5. UTICAJ KLINIČKIH I LABORATORIJSKIH PARAMETARA NA POSTIZANJE KOMPLETNE REMISIJE

**Tabela 21.** Uticaj pojedinih kliničkih karakteristika na postizanje kompletne remisije – ukupan uzorak ispitanika

	Kompletna remisija		P
	NE	DA	
Broj ciklusa	8	22	0,20
	6	23	
Starost	<55	11	0,09
	>55	34	
Pol	M	27	0,44
	Ž	18	
Klinički stadijum	I i II	6	0,21
	III i IV	39	
Ekstranodalna bolest	Nema	11	0,56
	Ima	34	
BMI	<25	19	0,19
	>25	26	

Na osnovu gore analiziranih podataka, možemo zaključiti da je starost ispitanika marginalno značajna, s obzirom na to da je p vrednost blizu nivoa od 0,05 ( $p = 0,09$ ). Stariji ispitanici ređe su postizali kompletnu remisiju. Na ostalim varijablama nije potvrđena statistička značajnost.

**Tabela 22:** Uticaj prognoznih indeksa (NCCN-IPI, rIPI, IPI i FLIPI, FLIPI2, PRIMA-PI) na postizanje kompletne remisije – ukupan uzorak ispitanika

	NCCN-IPI	rIPI	IPI
<b>Kompletna remisija</b>	-0,51*	-0,72**	-0,71**
	FLIPI	FLIPI2	PRIMA-PI
<b>Kompletna remisija</b>	-0,21	-0,14	-0,25

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

Negativna i značajna korelacija između postizanja kompletne remisije i prognoznih indeksa za DBKL potvrđena je u sva tri indeksa (NCCN-IPI, rIPI i IPI). Više vrednosti prognoznih indeksa su značajno povezane sa manjom šansom za postizanje kompletne remisije.

Kod ispitanika sa folikularnim limfomom, prognozni indeksi nisu imali uticaj na postizanje kompletne remisije.

Od laboratorijskih parametara koje smo analizirali (leukociti, limfociti, hemoglobin, trombociti, sedimentacija, CRP, fibrinogen, beta 2 mikroglobulin, LDH, albumin, feritin, Imunoglobulin G) jedino su serumske vrednosti laktat dehidrogenaze (LDH) i feritina statistički značajno uticale na postizanje kompletne remisije. Ispitanici sa manjom vrednošću LDH-a i feritina su češće postizali kompletnu remisiju. Drugi parametri nisu uticali na stopu postizanja kompletnih remisija (tabela 23).

**Tabela 23.** Uticaj laboratorijskih parametara na postizanje kompletne remisije – ukupan uzorak ispitanika

	Kompletna remisija	
	P	P
<b>Leukociti</b>	-0,07	0,62
<b>Limfociti</b>	-0,04	0,76
<b>Hemoglobin</b>	-0,02	0,91
<b>Trombociti</b>	-0,17	0,20
<b>Sedimentacija</b>	0,04	0,74
<b>CRP</b>	0,10	0,46
<b>Fibrinogen</b>	0,08	0,56
<b>beta2</b>	-0,11	0,42
<b>LDH</b>	-0,26	<b>0,04</b>
<b>Albumin</b>	-0,04	0,74
<b>Feritin</b>	-0,35	<b>0,01</b>
<b>IgG</b>	-0,12	0,36



## 6. UTICAJ KLINIČKIH I LABORATORIJSKIH PARAMETARA NA GUBITAK KOŠTANE GUSTINE

Da bi uočili odnose između pojedinih varijabli korelirali smo osteodenzitometrijske sa različitim kliničkim i laboratorijskim parametrima.

**Tabela 24.** Korelacija prognoznih indeksa i biohemijskih koštanih markera i koštane gustine

	<b>NCCN-IPI</b>	<b>rIPI</b>	<b>IPI</b>
<b>RANKL</b>	-0,02	0,12	-0,02
<b>OPG</b>	0,09	0,10	0,20
<b>CrossLaps</b>	0,13	0,11	0,09
<b>PINP</b>	-0,50*	-0,08	-0,17
<b>Lumbal Spine (T skor)</b>	-0,49*	-0,25	-0,32
<b>Femoral Neck (T skor)</b>	-0,52*	-0,27	-0,27
<b>Total Hip (T skor)</b>	-0,56*	-0,28	-0,37

	<b>FLIPI</b>	<b>FLIPI2</b>	<b>PRIMA-PI</b>
<b>RANKL</b>	-0,08	-0,05	-0,17
<b>OPG</b>	0,01	0,23	0,22
<b>CrossLaps</b>	0,12	0,14	0,10
<b>PINP</b>	-0,19	-0,11	-0,10
<b>Lumbal Spine (T skor)</b>	-0,10	0,02	-0,51*
<b>Femoral Neck (T skor)</b>	0,24	0,12	-0,13
<b>Total Hip (T skor)</b>	0,12	0,09	-0,35

Postoji značajna negativna korelacija između NCCN-IPI prognoznog indeksa i koštane gustine, izražene u T skor, na nivou lumbalne kičme, kuku i vratu butne kosti. Ispitanici koji su prema NCCN-IPI prognoznom indeksu imali višu kategoriju, odnosno lošiju prognozu, imali su niže vrednosti T skora na lumbalnoj kičmi, kuku i vratu butne kosti (tabela 24).

Postoji statistički značajna negativna korelacija između PRIMA-PI indeksa i T skora na nivou lumbalne kičme. Više kategorije u PRIMA-PI prognoznom indeksu koreliraju sa nižim T skorom na nivou lumbalne kičme (tabela 24).

Ostale korelacije nisu statistički značajne.

**Tabela 25.** Univarijatna analiza faktora povezanih sa gubitkom koštane gustine (BMD) na nivou lumbalne kičme, vratu femura i kuku – ispitivana grupa

	Lumbal Spine		Femoral Neck		Total Hip	
	r/ρ	p	r/ρ	p	r/ρ	p
<b>Pol (m/ž)</b>	-0,15	0,44	0,09	0,64	0,09	0,64
<b>Godine (≥55 / &lt;55)</b>	0,09	0,63	-0,02	0,93	0,01	0,99
<b>Ciklus (6/8)</b>	-0,08	0,68	-0,15	0,45	-0,15	0,43
<b>Klinički stadijum (I i II / III i IV)</b>	-0,23	0,22	-0,17	0,37	-0,13	0,50
<b>ECOG (0 i 1 / 2)</b>	0,06	0,76	0,08	0,67	0,06	0,77
<b>ExNod (da/ne)</b>	0,11	0,55	0,28	0,14	0,22	0,25
<b>LDH</b>	-0,29	0,12	-0,32	0,09	-0,37	0,04
<b>BMI</b>	-0,02	0,90	0,11	0,57	0,09	0,64
<b>Albumin</b>	-0,06	0,77	-0,11	0,57	-0,05	0,79
<b>ALP</b>	0,01	0,98	-0,11	0,57	-0,13	0,48
<b>Ca jonizovani</b>	0,13	0,51	0,13	0,51	0,22	0,24
<b>Vitamin D</b>	-0,02	0,91	0,08	0,67	0,06	0,77
<b>PTH</b>	-0,01	0,94	0,14	0,46	0,13	0,50
<b>Holesterol</b>	-0,13	0,51	-0,10	0,59	0,10	0,74
<b>RANKL</b>	-0,03	0,87	-0,03	0,88	0,02	0,59
<b>OPG</b>	0,22	0,25	0,08	0,67	0,13	0,91
<b>Cross Laps</b>	-0,55	0,00	-0,72	0,00	-0,66	0,00
<b>PINP</b>	-0,11	0,58	-0,18	0,34	-0,10	0,59
<b>Kortikosteroidi (kumulativna doza/TP)</b>	-0,09	0,63	0,09	0,63	0,05	0,79

LDH i *CrossLaps* su bili jedini statistički značajni parametri. Veću koštanu gustinu na nivou lumbalne kičme, kuku i vratu butne kosti su imali ispitanici sa manjim *CrossLaps*-om ( $p = 0,00$ ). Na nivou kuka, vrednost LDH je bila statistički značajna ( $p = 0,04$ ), odnosno manji LDH su imali ispitanici sa većom koštanom gustinom na ovom nivou. Vrednost LDH je bila marginalno značajna na nivou vrata butne kosti ( $p = 0,09$ ) (tabela 25).

**Tabela 26.** Multivarijatna analiza faktora povezanih sa gubitkom koštane gustine (BMD) na nivou lumbalne kičme, vratu butne kosti i kuku – ispitivana grupa

	Lumbal Spine F = 6,35, R <sup>2</sup> = 0,19, p = 0,02			Femoral Neck F = 5,83, R <sup>2</sup> = 0,30, p = 0,01			Total Hips F = 5,54, R <sup>2</sup> = 0,29, p = 0,01		
	β	t	p	β	t	p	B	t	p
<b>CrossLaps</b>	-0,43	-2,52	0,02	-,55	-3,14	0,00	-0,54	-3,33	0,00
<b>LDH</b>	-	-	-	-0,01	-0,02	0,99	-0,03	-0,16	0,87

Uvidom u rezultate multiple regresione analize ispitivane grupe jedini značajni prediktor za gubitak koštane gustine je *CrossLaps* koji u modelu sa LDH kao značajnim prediktorom iz univarijatne analize, predviđa 19% varijanse ovog modela na nivou lumbalne kičme, 30% na nivou vrata butne kosti i 29% na nivou kuka. Dakle, 29% T skora, odnosno koštane gustine na nivou lumbalne kičme može biti objašnjeno uticajem *CrossLaps*-a i LDH-a, kao i 30% T skora na nivou vrata butne kosti, odnosno 29% T skora na nivou kuka. Ostali procenti u modelu se objašnjavaju drugim parametrima, koji nisu analizirani s obzirom da nisu pokazali statističku značajnost u univarijantnoj analizi. U sva tri slučaja, niže vrednosti *CrossLaps*-a utiču na više vrednosti T skora ( $p = 0,00$ ).

**Tabela 27.** Univarijatna analiza faktora povezanih sa gubitkom koštane gustine (BMD) na nivou lumbalne kičme, vratu butne kosti i kuku – kontrolna grupa

	Lumbal Spine		Femoral Neck		Total Hip	
	r/ρ	P	r/ρ	p	r/ρ	p
<b>Pol</b> (m/ž)	-0,14	0,44	-0,22	0,24	-0,22	0,24
<b>Godine</b> ( $\geq 55$ / $< 55$ )	0,14	0,47	-0,44	<b>0,02</b>	0,30	0,11
<b>Ciklus</b> (6/8)	-0,07	0,70	0,14	0,48	0,12	0,54
<b>Klinički stadijum</b> (I i II / III i IV)	0,15	0,44	0,20	0,29	0,28	0,13
<b>ECOG</b> (0 i 1 / 2)	-0,05	0,79	-0,03	0,86	-0,07	0,69
<b>ExNod</b> (da/ne)	-0,16	0,40	-0,25	0,45	-0,06	0,74
<b>LDH</b>	0,12	0,54	0,19	0,32	0,07	0,71
<b>BMI</b>	-0,26	0,17	0,11	0,55	0,09	0,61
<b>Albumin</b>	-0,13	0,49	-0,21	0,26	-0,26	0,17
<b>ALP</b>	0,06	0,74	0,21	0,26	0,18	0,34
<b>Ca jonizovani</b>	-0,04	0,82	0,21	0,26	0,16	0,39
<b>Vitamin D</b>	0,10	0,60	0,44	<b>0,02</b>	0,32	<b>0,09</b>
<b>PTH</b>	-0,10	0,60	0,23	0,22	0,17	0,36
<b>Holesterol</b>	-0,47	<b>0,01</b>	-0,29	0,13	-0,35	<b>0,05</b>
<b>RANKL</b>	-0,27	0,15	-0,10	0,59	-0,20	0,28
<b>OPG</b>	0,08	0,68	0,05	0,77	0,15	0,45
<b>Cross Laps</b>	0,10	0,60	-0,08	0,67	-0,09	0,62
<b>PINP</b>	-0,19	0,33	-0,09	0,63	-0,21	0,28
<b>Kortikosteroidi</b> (kumulativna doza/TP)	-0,20	0,28	-0,48	<b>0,01</b>	-0,40	<b>0,03</b>

Od svih gore ispitivanih parametara, u kontrolnoj grupi ispitanika starost, vitamin D, holesterol i kumulativna doza kortikosteroida (deljena prema kvadratu telesne površine) su pokazali statističku značajnost. Na nivou lumbalne kičme veći T skorovi su negativno i značajno povezani sa holesterolom, odnosno ispitanici sa višim holesterolom su imali manju

koštanu gustinu ( $p = 0,01$ ). Veći T skorovi na nivou vrata butne kosti su povezani sa mlađim uzrastom ( $p = 0,02$ ) i višim nivoom vitamina D ( $p = 0,02$ ), dok je na nivou kuka, veća koštana gustina negativno povezana sa holesterolom ( $p = 0,05$ ) i pozitivno (marginalno) sa vitaminom D ( $p = 0,09$ ).

**Tabela 28.** Multivarijantna analiza faktora povezanih sa gubitkom koštane gustine (BMD) na nivou lumbalne kičme, vratu butne kosti i kuku – kontrolna grupa

	<b>Lumbal Spine</b> F = 4,82, R <sup>2</sup> = 0,15, <b>p = 0,04</b>			<b>Femoral Neck</b> F = 3,48, R <sup>2</sup> = 0,21, <b>p = 0,05</b>			<b>Total Hips</b> F = 2,05, R <sup>2</sup> = 0,13, <b>p = 0,15</b>		
	B	t	p	β	t	p	β	t	p
<b>Godine</b>	-	-	-	-0,13	00,94	0,35	-	-	-
<b>Vit.D</b>	-	-	-	0,06	00,42	0,61	0,09	0,69	0,50
<b>Holesterol</b>	-0,38	-	<b>0,04</b>	-	-	-	-0,19	-	0,16
		20,20						10,41	
<b>Kortiko</b>	-	-	-	-	-10,03	0,31	-0,13	-	0,32
				0,14				10,01	

Značajni prediktori iz univarijantne analize objašnjavaju 15% modela na nivou lumbalne kičme. 15% modela se nalazi pod uticajem starosti ispitaika, vitamina D, holesterola i kortikosteroida. Prediktivni model nije značajan i nema značajnih doprinosa prediktorskih varijabli T skoru na nivou vrata butne kosti i kuka, što znači da navedeni parametri statistički značajni u univarijantnoj analizi nisu imali uticaj na vrednost T skora na nivou vrata butne kosti, odnosno kuka u multivarijantnoj analizi. Niže vrednosti holesterola značajno utiču na povećanje koštane gustine lumbalne kičme ( $p = 0,04$ ).

**Tabela 29.** Univarijantna korelaciona analiza kumulativne doze kortikosteroida (deljena sa kvadratom telesne površine ispitanika) sa gubitkom koštane gustine (BMD) na nivou lumbalne kičme, vratu butne kosti i kuku i koštanim biohemijskim markerima

	<b>Ispitivana grupa</b> kortiko/TP		<b>Kontrolna grupa</b> kortiko/TP	
	r	P	R	P
<b>LS</b>	-0,09	0,63	-0,20	0,28
<b>FN</b>	0,09	0,63	-0,48	<b>0,01</b>
<b>TH</b>	0,05	0,79	-0,40	<b>0,03</b>
<b>RANKL</b>	0,12	0,51	0,01	0,96
<b>OPG</b>	0,08	0,67	-0,12	0,52
<b>Cross Laps</b>	-0,08	0,67	-0,06	0,76
<b>PINP</b>	-0,14	0,47	-0,21	0,26

Univarijatna korelaciona analiza ukazala je na postojanje značajnih negativnih korelacija između primljene doze kortikosteroida i koštane gustine na nivou vrata butne kosti i kuka i to samo kod kontrolne grupe ispitanika, odnosno ispitanika koji nisu primili monoklonsko anti-CD20 antitelo. Veće doze kortikosteroida su primili ispitanici kontrolne grupe sa manjom koštanom gustinom na nivou vrata butne kosti ( $p = 0,01$ ) i kuka ( $p = 0,03$ ).

## VI DISKUSIJA

Limfomi su jedna od najčešćih hematoloških bolesti u svetu. Predstavljaju heterogenu grupu malignih tumora limfnog tkiva sa veoma različitim kliničkim i patohistološkim karakteristikama, imunofenotipskim i genetskim abnormalnostima. Tokom proteklih decenija postignut je izuzetan napredak u lečenju ovih bolesti, što je rezultiralo većim stopama preživljavanja bolesnika [68]. Uz poboljšanje ishoda lečenja, postterapijske komplikacije postaju još jedan dodatni terapijski izazov za kliničare. Suportivna nega značajno poboljšava kratkoročni morbiditet povezan sa lečenjem, međutim, dugoročne posledice, kao što je osteoporoza, ostaju problematične [166]. Postterapijska osteoporoza je ozbiljan problem kod bolesnika sa malignim oboljenjima jer povećava rizik od preloma što narušava i pogoršava kvalitet života [85].

Imunoterapija primenom anti-CD20 monoklonskog antitela (rituksimab), postala je standardni deo terapijskih protokola u lečenju B ćelijskih limfoproliferativnih neoplazmi i pojedinih autoimunih bolesti. Uticaj anti-CD20 monoklonskog antitela na koštanu gustinu i metabolizam ispitivan je kroz brojne studije. Oprečne rezultate dala su istraživanja rađena na bolesnicima sa reumatoidnim artritismom i sistemskim eritemskim lupusom. Svega nekoliko studija sprovedeno je do sada na bolesnicima sa nehoćkinskim limfomom, koje takođe daju nehomogene rezultate [83-85, 167].

Iako je dobro poznato da su bolesnici sa limfomom u velikom riziku od gubitka koštane gustine i pojave patoloških preloma, kako u vreme postavljanja dijagnoze, tokom i nakon primene hemioterapije, tako i posle autologne ili alogene transplantacije matičnih ćelija hematopoeze, za sada ne postoje jasne smernice u vezi ispitivanja koštane gustine i koštanog metabolizma ovih bolesnika, niti postoje preporuke za profilaktičku primenu tretmana za ubrzani koštani gubitak [167, 168]. Aktuelne smernice za lečenje NHL-a (vodiči evropskog i američkog udruženja onkologa: *European Society for Medical Oncology* (ESMO) i *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN)) ne zahtevaju procenu mineralne koštane gustine kostiju pre započinjanja lečenja bolesnika sa NHL-om, niti savetuju primenu bisfosfonata tokom primene hemioterapije [169-172].

Prema raspoloživim literaturnim podacima, ovo istraživanje, kojim smo pokušali da procenimo stepen koštanog remodelovanja pre i posle hemioterapije, i uticaj anti-CD20 monoklonskog antitela na koštani metabolizam kod novodijagnostikovanih bolesnika sa NHL-om, prvo je ovog tipa koje je sprovedeno u Srbiji. Takođe, pretražujući svetsku

literaturu, nismo pronašli studiju koja je ispitivala isključivo uticaj gore pomenutog monoklonskog antitela na koštani metabolizam kod bolesnika sa nehočkinskim limfomom.

Naše, prospektivno istraživanje je obuhvatilo 60 odraslih, novodijagnostikovanih ispitanika sa B ćelijskim nehočkinskim limfomom. Prema načinu lečenja, ispitanici su bili podeljeni u dve grupe, ispitivanu i kontrolnu. Kontrolna grupa lečena je standardnim hemioterapijskim protkolima, dok je ispitivana grupa uz standardnu terapiju dobijala i anti-CD20 monoklonsko antitelo (rituksimab).

U našem uzorku, većina ispitanika je bila muškog pola (37/60) i to skoro čak dve trećine (oko 61,6%) od ukupnog broja ispitanika. Prevaga muškog pola postojala je i u ispitivanoj (17/30) i u kontrolnoj grupi (20/30). Nije postojala signifikantna statistička razlika u polnoj strukturi između dve grupe ispitanika ( $p=0,43$ ). Naši rezultati prate literaturne podatke koji takođe, navode da muškarci češće obolevaju od NHL-a [6, 7]. U visoko razvijenim zemljama, pripadnici muške populacije imaju 39% veće šanse da obole od NHL-a i 60% veću verovatnoću da će preminuti od ove bolesti [6, 7, 173]. Za sada nisu poznati razlozi veće incidencije limfoidnih neoplazmi kod muškaraca. Iako do sada nije dokazano da su limfomi hormon-zavisni tumori postoje podaci da se smanjena stopa NHL-a kod žena može objasniti direktnim inhibitornim dejstvom estrogena na proliferaciju limfomskih ćelija, kao i njegovim imunomodulatornim efektima [174-176].

Medijana starosti naših ispitanika iznosila je 63,5 godina, dok je prosečna starost bila 60,5 godina. Najveći broj ispitanika u obe grupe bio je starosti između 60 i 70 godina. Iako Studentovim t-testom za nezavisne uzorke nije potvrđena statistički značajna razlika u odnosu na starost, ispitivana grupa je bila nešto mlađa u odnosu na ispitanike kontrolne grupe ( $56,73 \pm 12,42$  vs.  $64,33 \pm 10,88$ ). Prema podacima Američkog nacionalnog instituta za karcinom, NHL-i se najčešće dijagnostikuju u starosnoj dobi iznad 65 godina, dok je medijana starosti prilikom postavljanja dijagnoze 67 godina [177]. Medijana starosti naših ispitanika bila je nešto niža u odnosu na literaturne podatke, što se može objasniti kriterijumima za uključivanje ispitanika u ovo istraživanje. U našem istraživanju nisu uključeni ispitanici koji u svakodnevnoj terapiji koriste lekove sa uticajem na koštani metabolizam (pogledati kriterijume za neuključivanje u studiju), kao ni ispitanici sa komorbiditetima: bubrežna, jetrena insuficijencija, odnosno drugi maligniteti koji se, takođe, češće dijagnostikuju u starijoj populaciji [178-180].

Naše dve grupe ispitanika nisu se razlikovale u odnosu na telesnu visinu (169 cm), dok je kontrolna grupa imala veću telesnu težinu ( $71,98 \pm 16,07$  vs.  $76,46 \pm 15,06$  kg). Nije bilo

statistički značajne razlike između grupa u pogledu telesne visine ( $p= 0,27$ ), odnosno telesne težine ( $p= 0,97$ ). Više od polovine ispitanika (53,3%) bilo je, prema vrednosti indeksa telesne mase ( $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ), predgojazno ili gojazno. Povezanost između antropometrijskih parametara i rizika od razvoja NHL-a bila je predmet istraživanja brojnih meta-analiza koje su dale oprečne rezultate. Kada je sa svojim saradnicima pronašao vezu između viših ispitanika i povećanog rizika za razvoj limfoma, dok povećana telesna težina nije bila značajan faktor rizika u njegovom istraživanju [181]. Druge studije govore u prilog da gojaznost, koja se danas smatra pandemijskom bolešću zbog svoje visoke prevalence, predstavlja signifikantan faktor rizika za mnoge vrste karcinoma, uključujući limfom. Postoje dokazi da je leptin, koga proizvode adipociti odgovoran za preteranu stimulaciju imunološkog sistema i proliferaciju tumorskih ćelija. Gojaznost je povezana kako sa limfomagenozom, tako i sa lošijim ishodom i lošijim odgovorom na različite terapijske modalitete [182-183].

U ukupnom uzorku naših ispitanika, većina obolelih imala je difuzni B-krupnoćelijski limfom, odnosno folikularni limfom, 25% ispitanika. Manje su bili zastupljeni ispitanici koji su bolovali od MZL-a (22%), MCL-a (18%), SLL-a i WM-e (5%). U ispitivanoj grupi uključeni su ispitanici sa DBKL-om i FL-om, dok su u kontrolnoj grupi uključeni ispitanici sa MZL-om, MCL-om, SLL-om i WM-om. Učestalost pojedinih podtipova NHL-a, DBKL-a i FL-a, u ispitivanom uzorku je očekivana [10,173]. Nešto manji procenat zastupljenosti ispitanika sa SLL-om, možemo objasniti činjenicom da asimptomatski bolesnici, sa lokalizovanom bolešću, ne zahtevaju lečenje u momentu postavljanja dijagnoze, što sa druge strane objašnjava i veću frekvencu ispitanika sa MZL i MCL, koji su zajedno sa ispitanicima obolelih od limfoma malih limfocita, činili kontrolnu grupu koja je lečena primenom standardnih hemioterapijskih protokola [6, 10, 184].

Za određivanje kliničkog stadijuma bolesti već se više od pedeset godina koristi An Arbor sistem. Najveći broj ispitanika dijagnostikovani su u uznapredovalom III i IV kliničkom stadijumu bolesti – ukupno 83,3% ispitanika, odnosno 15% - 20% više u odnosu na literaturne podatke, što može ukazivati na kasno postavljanje dijagnoze u našoj populaciji. Sa druge strane, postoje podaci da čak 90% bolesnika sa MCL-om se dijagnostikuje u III i IV kliničkom stadijumu [185-188]. U ispitivanoj grupi je u IV kliničkom stadijumu bilo 53,3% ispitanika, dok je u kontrolnoj grupi bilo 80% ispitanika u IV kliničkom stadijumu ( $p=0,028$ ). S obzirom na to da su ispitanici bili dijagnostikovani u odmaklim kliničkim stadijumima bolesti, bio je očekivan visok procenat prisustva sistemskih, B-simptoma. 73,3% pripadnika ispitivane grupe, odnosno 80% ispitanika kontrolne grupe imalo je B-simptome na početku



lečenja. Sharma i saradnici dokazali su pozitivnu korelaciju postojanja B simptoma i uznapređovalog kliničkog stadijuma bolesti [188]. Poznato je da *Bulky* bolest, koja je bila prisutna kod 23,3% naših ispitanika, predstavlja negativan prognostički faktor kod bolesnika sa NHL-om. Naši rezultati prati rezultate drugih studija [189,190]. U eri rituksimaba, *Bulky* bolest se sve manje smatra negativnim prognostičkim faktorom koji ne utiče na preživljavanje bolesnika [189].

Primarno ekстранodalnu lokalizaciju, imalo je 75% naših ispitanika, pri čemu su najčešće ekстранodalne lokalizacije bile koštana srž (41,6%), plućni parenhim (13,3%) i gastrointestinalni trakt (11,6%), što može objasniti i veliki procenat ispitanika u IV kliničkom stadijumu bolesti. Infiltracija koštane srži bila je češća u kontrolnoj grupi ispitanika u odnosu na ispitivanu grupu ( $p=0,0035$ ). Iako postoje podaci da je incidenca ekстранodalne lokalizacije kod limfoma u porastu, ukupan broj naših ispitanika, koji su imali primarno ekстранodalnu lokalizaciju na početku lečenja, bio je znatno veći u odnosu na rezultate drugih studija, koje detektuju oko 30% - 40% ispitanika sa ekстранodalnom bolešću [191-193]. Ipak, rezultati studije Krol-a i saradnika se poklapaju sa našim, s obzirom na to da su i oni identifikovali koštanu srž kao najčešće mesto ekстранodalne lokalizacije NHL, kod 35% ispitanika [194]. Matasar i saradnici, takođe, beleže visok procenat ekстранodalne lokalizacije NHL-a, 80% kod folikularnog limfoma, 75% kod leukemijske faze mantle ćelijskog limfoma, kod 90% ispitanika sa spleničnim limfomom marginalne zone, odnosno 40% bolesnika sa difuznim B-krupnoćelijskim limfom [55].

U odnosu na ECOG performans status između ispitivane i kontrolne grupe postojala je statistički značajna razlika ( $p < 0,01$ ), u smislu da je, u kontrolnoj grupi veći broj ispitanika imao ECOG  $\geq 2$  (33% vs. 7%), a u ispitivanoj ECOG  $\leq 1$  (93% vs. 67%), što možemo objasniti starijoj životnoj dobi kontrolne grupe [195].

Lečenje bolesnika sa NHL-om i pridruženim bolestima može predstavljati izazov kako zbog mogućih interakcija koje mogu remetiti efikasnost lečenja, tako i zbog činjenice da komorbiditeti značajno utiču na preživljavanje bolesnika sa limfomom [196]. Na inicijalnoj prezentaciji, više od 50% bolesnika sa NHL-om ima jednu ili više koegzistirajućih bolesti [197]. Naših 70% ispitanika prilikom uključivanja u istraživanje je prijavilo neku pridruženu bolest. Najviše ispitanika je imalo povišen krvni pritisak (45%), hroničnu kardiomiopatiju (10%) i šećernu bolest (13,3%), što prati literaturne podatke [198].

Distribucija ispitanika prema prognoznim indeksima je bila sledeća: najviše ispitanika sa DBKL-om je pripadalo grupi niskog, odnosno srednjeg visokog rizika prema IPI indeksu

(33,3%), dok je prema rIPI indeksu najviše ispitanika pripadalo grupi dobre prognoze (66,6%), odnosno grupi niskog srednjeg rizika prema NCCN-IPI indeksu (46,6%). Najviše ispitanika sa FL-om prema FLIPI indeksu je pripadalo grupi srednjeg rizika (50%), odnosno visokog rizika prema FLIPI-2 indeksu (66,6%), odnosno grupi visokog rizika prema PRIMA-PI indeksu (53,3%). Prema MALT-IPI indeksu, u grupi srednjeg rizika nalazilo se najviše ispitanika sa limfomom marginalne zone (53,8%), dok je prema MIPI indeksu najviše ispitanika sa MCL-om bilo, takođe, u grupi srednjeg rizika (63,6%). Svi ispitanici sa *Waldenstromovom* makroglobulinemijom su pripadali grupi visokog rizika prema ISSWM indeksu. Dobijeni rezultati ne prate u potpunosti literaturne podatke, u kojima najviše ispitanika sa DBKL-om pripada grupi niskog rizika prema IPI indeksu, odnosno grupi loše prognoze prema rIPI indeksu. U studiji korejskih naučnika najviše ispitanika sa MALT limfomom pripadalo je grupi niskog rizika prema MALT-IPI indeksu, dok su Numata i saradnici u svom istraživanju uključili najveći broj ispitanika sa folikularnim limfomom koji su prema FLIPI indeksu pripadali grupi visokog rizika, odnosno prema FLIPI2 indeksu grupi srednjeg rizika [58,199,200]. Razlog diskrepance rezultata u odnosu na druge autore, pronalazimo u malom broju ispitanika koji su uključeni u naše istraživanje.

Više od 35 godina, standardni hemioterapijski režim za lečenje bolesnika sa B-ćelijskim limfomom predstavlja CHOP protokol za koji je dobro poznato da smanjuje koštanu gustinu [201, 202]. U našem istraživanju ukupno je 48 ispitanika lečeno prema CHOP prokolu, 12 je primilo CVP protokol dok je 6 ispitanika, primilo i Etopozid. Ispitivana grupa je primila uz CHOP i CVP i anti-CD20 monoklonsko antitelo. U ispitivanoj grupi 4 ispitanika su lečena prema R-CHOEP protokolu, dok je u kontrolnoj grupi samo dvoje ispitanika primilo kombinaciju Etopozid-a i CHOP-a. Kompletna remisija potvrđena je kod 15 ispitanika (11 ispitivana vs. 4 kontrolna grupa), parcijalni odgovor kod 22 ispitanika (13 ispitivana vs. 9 kontrolna grupa), dok je kod 5 ispitanika bolest progredirala (0 ispitivana vs. 5 kontrolna grupa). Postojala je statistički značajna razlika u postizanju terapijskog odgovora između dve grupe ispitanika ( $p < 0,01$ ).

Analizom parametara krvne slike i biohemijskih markera aktivnosti bolesti u ispitivanoj grupi vidimo da je statistički, značajno promenjen broj leukocita, koji su bili niži nakon terapije ( $p = 0,04$ ). Navedeni rezultat smo mogli očekivati, s obzirom na to da je citotoksična terapija, koja se primenjuje u lečenju malignih bolesti, odnosno limfoma, visoko neselektivna i da supresijom hematopoetskog sistema izaziva citopenije različitog stepena [203]. U prilog tome govore i niže vrednosti limfocita nakon terapije u ovom istraživanju.

Postterapijski je verifikovano smanjenje vrednosti većine biohemijskih markera aktivnosti bolesti (vrednosti brzine sedimentacije, CRP, laktat dehidrogenaze, beta 2 mikroglobulina i feritina), što korelira i sa terapijskim odgovorom postignutim u ovoj grupi ispitanika (80% ispitanika je imalo parcijalni ili kompletni odgovor). Vrednosti albumina su bile više nakon terapije ( $p=0,22$ ), što prati veliki procenat pozitivnog odgovora na terapiju. Hipoalbuminemija je povezana sa lošijom prognozom bolesnika sa malignitetima, dok je preterapijska vrednost albumina sastavni deo brojnih hematoloških prognostičkih indeksa [204]. U kontrolnoj grupi, potvrđen je statistički značajan postterapijski porast vrednosti hemoglobina, kao i značajan statistički pad limfocita, brzine sedimentacije i beta 2 mikroglobulina. Takođe, u ovoj grupi ispitanika, nakon terapije, ali bez statističke značajnosti, zabeležen je pad broja leukocita, CRP, LDH, i porast albumina, fibrinogena i feritina. Gore navedene statističke značajnosti, kao i smanjenje vrednosti CRP, LDH i leukocita, odnosno porast vrednosti albumina bi se moglo očekivati kod grupe ispitanika sa parcijalnim, odnosno kompletnim terapijskim odgovorima, odnosno u istraživanju kod 43,3% ispitanika.

Od analiziranih parametara koštanog metabolizma ispitivane grupe, statističku značajnost pokazao je postterapijski porast vrednosti P1NP-a ( $p= 0,00$ ). U ispitivanoj grupi, nakon terapije, vrednost OPG-a se smanjila, kao i ALP-a, dok je zabeležen porast vrednosti *CrossLaps*-a i RANKL-a, ali bez statističke značajnosti ( $p=0,06$ ;  $p=0,21$ ). Pre započinjanja terapije, 70% ispitanika ove grupe je imalo vrednosti P1NP-a u referentnom opsegu, dok je kod 23,3% ispitanika njegova vrednost povišena. Nakon terapije zabeležili smo povišene vrednosti P1NP-a kod čak 83,3% ispitanika. Vrednost *CrossLaps*-a su inicijalno bile u referentnom opsegu kod 36,6% ispitanika, dok su kod 30% ispitanika merene povišene vrednosti ovog koštanog markera. Postterapijski je veći broj ispitanika imao povišene vrednosti *Crosslaps*-a (43,3%). Dokazano je da hemioterapija dovodi do ubrzanog koštanog remodelovanja, što rezultira i poremećajem odnosa i koncentracije biohemijskih markera koštane sinteze i resorpcije [205]. Naši rezultati prate literaturne podatke. Terpos, ispitujući koštanu gustinu u grupi od 61-og bolesnika sa NHL-om, lečenih imunochemioterapijom, je dokazao da postterapijski dolazi do porasta vrednosti, kako markera koštane razgradnje (*Crosslaps*, TRACP-5b), tako i markera koštane sinteze (osteokalcin, bALP, Dkk-1), ističući ubrzani koštani metabolizam kod ove grupe bolesnika [167]. Do sličnih rezultata došli su u svojoj studiji Paccou i saradnici, koja je obuhvatila 41-og bolesnika sa Hočkinovim limfomom (HL) i NHL-om, lečenih imunochemioterapijom, kojima je praćen nivo promena markera koštanog remodelovanja, *Crosslaps*-a i alkalne fosfataze specifične za kost. Kao i u

našem istraživanju, bez statističke značajnosti, vrednost ukupne alkalne fosfataze se smanjila, dok je povišenje *Crosslaps*-a bilo statistički značajno ( $p=0.004$ ). Statistički značajno povišenje *Crosslaps*-a Paccou, kao i Terpos, objašnjava intenzivnim koštanim remodelovanjem u ovoj grupi ispitanika nakon primene imunohemioterapije [84]. Nedavna studija, američkih autora, koja je obuhvatila 162 bolesnika sa agresivnim tipom NHL-a, je pokazala da bolesnici koji su lečeni R-CHOP i *CHOP-like* prokolima imaju veću incidencu koštanih preloma. U ovoj studiji 10% ispitanika je napravilo patološku frakturu unutar prve godine lečenja. Za veću incidencu koštanih preloma u ovoj grupi ispitanika, Huang i saradnici krive kako biologiju same bolesti, odnosno limfoma, tako i terapiju koja se primenjuje u lečenju ovih bolesnika. Takođe, dodaju da povećan broj koštanih preloma u ovoj ispitivanoj grupi može biti posledica periferne polineuropatije uzrokovane primenom vinkristina. Visoka prevalenca preloma, pre započinjanja lečenja bolesnika sa NHL-om, sugeriše da neki, za sada nepoznati aspekt biologije limfoma utiče povoljno na koštanu razgradnju, dovodeći do koštane slabosti [201]. U kontrolnoj grupi ispitanika, u našem istraživanju jedina statistički značajna promena u pogledu laboratorijskih parametara koštanog metabolizma, bila je porast vrednosti P1NP-a ( $p=0,00$ ). Referentnu vrednost P1NP-a, pre terapije, imalo je 25 ispitanika kontrolne grupe (83,3%), dok je povišena vrednost izmerena u 13,3% ispitanika. Ovi rezultati su očekivani, s obzirom na to da je čak 20 ispitanika kontrolne grupe imalo dobru koštanu gustinu, a da nijedan ispitanik nije imao osteoporozu pre započinjanja lečenja. Nakon terapije, čak 22 ispitanika (73,3%) je imalo povišene vrednosti P1NP-a. Normalne vrednosti *Crosslaps*-a, pre terapije je imalo 18 ispitanika, odnosno 11 ispitanika nakon terapije. Povišen *Crosslaps*, incijalno je izmeren kod 7 ispitanika, a nakon terapije kod duplo većeg broja ispitanika. Veći broj ispitanika kod kojih je detektovana povišena vrednost *Crosslaps*-a nakon terapije, u odnosu na početak lečenja, je očekivan, poznavajući negativan uticaj polihemioterapije na koštani metabolizam [146, 148-151]. Posmatrajući rezultate kontrolne grupe, možemo uvideti da se nakon hemioterapije odvijao intenzivan proces koštanog remodelovanja, koji je i očekivan, s obzirom na multifaktorijalan štetan uticaj citostatika na koštano tkivo. Poznato je da polihemioterapija dovodi do gubitka koštane gustine kako direktno, kroz disregulaciju diferencijacije i aktivnosti osteoblasta i/ili osteoklasta, tako i indirektno, dovodeći do razvoja hronične bubrežne slabosti, poremećaja elektrolita, kao i hormonalnih disbalansa, odnosno hipogonadizma. Drugi mehanizmi štetog uticaja polihemioterapije uključuju, pro-apoptični efekat na osteoblaste i osteocite, kao i ubranu diferencijaciju ćelija strome koštane srži u adipocite [149].

Iako nije statistički značajno, nakon terapije u obe grupe ispitanika verifikovan je porast vrednosti koštanog biohemijskog markera RANKL-a, u ispitivanoj grupi za 4,1% ( $p=0,6$ ), odnosno u kontrolnoj za 1,7% ( $p=0,8$ ), što oslikava nešto veću koštanu resorpciju ispitivane grupe. Kontrolna grupa ispitanika, sa druge strane, imala je više vrednosti RANKL-a u odnosu na ispitivanu grupu, i inicijalno ( $p<0,05$ ) i nakon hemioterapije ( $p<0,05$ ). Više vrednosti RANKL-a kontrolne grupe, u odnosu na ispitivanu, možemo povezati sa starosnim razlikama grupa. Kontrolna grupa je bila starija, a poznato je da osteoklastogeneza se povećava sa godinama starosti dovodeći do povećane ekspresije RANKL-a [206]. Poznato je da terapija limfoma visokim dozama glukokortikoida i alkilirajućih agenasa može dovesti do preranog gubitka koštane mase, na temelju intenzivne koštane resorpcije. Povećana proizvodnja RANKL-a od strane osteoblasta dovodi do diferencijacije, aktivacije i preživljavanja osteoklasta, što rezultira povećanom resorpcijom kostiju [129]. Anargyrou i saradnici u svojoj studiji, takođe, verifikuju, bez statističke značajnosti, postterapijski porast serumske koncentracije RANKL-a kod bolesnika sa NHL-om, objašnjavajući ga intenzivnim koštanim remodelingom nakon terapije, odnosno intenzivnim procesom zamene stare kosti, koju razgrađuju osteoklasti, i izgradnje nove, koju stvaraju osteoblasti [85]. Porast vrednosti RANKL-a je očekivan, s obzirom na to da znamo da polihemioterapija podstiče koštanu resorpciju brojnim mehanizmima (ovarijalna insuficijencija, povećane osteoklastne aktivnosti, mijelosupresija, apoptoza osteocita i drugi mehanizmi) i da RANKL efikasno reguliše proces resorpcije kosti, inhibicijom apoptoze i stimulacijom proliferacije osteoklasta [134, 149, 151].

Promena serumske koncentracije vrednosti OPG statistički se značajno ne razlikuje ni u jednoj grupi ispitanika (ispitivana grupa  $p=0,71$ , kontrolna grupa  $p=0,32$ ). Nakon lečenja, u ispitivanoj grupi je došlo do smanjenja OPG-a, dok je u kontrolnoj grupi došlo do povećanja njegove vrednosti, što u ovoj grupi ispitanika govori u prilog smanjenja osteoklastogeneze. Kontrolna grupa ispitanika imala je, inicijalno, više vrednosti OPG u odnosu na ispitivanu, što opet možemo povezati sa starijom populacijom uključenom u kontrolnu grupu. Italijanska grupa naučnika je 2019. objavila studiju u kojoj je potvrdila pozitivnu korelaciju između vrednosti OPG-a i godina starosti. Takođe, došli su do zaključka da kod starijih osoba, povećanje nivoa osteoprotegerina može odražavati progresivnu akumulaciju organskih oštećenja, što rezultira razvojem biološke insuficijencije i bolesti [207]. Postterapijsko smanjenje OPG-a u ispitivanoj grupi ( $p=0,48$ ), a povećanje istog parametra u kontrolnoj grupi ( $p=0,09$ ) možemo objasniti efektima anti-CD20 monoklonskog antitela. Rituksimab je humano/mišje himerno monoklonsko antitelo sa specifičnim afinitetom za CD20,

transmembranski protein B limfocita. Odmah nakon primene rituksimaba, uočeno je brzo smanjenje cirkulišućih CD20+ B ćelija [208]. B limfociti predstavljaju važan izvor OPG-a, ali u inflamatornim i malignim stanjima proizvodnja OPG-a se smanjuje, pomerajući se ka RANKL-u koji proizvode T limfociti aktivirani pro-inflamatornim citokinima. Povećana proizvodnja RANKL-a u B aktiviranim limfocitima, menja odnos RANKL/OPG i promoviše gubitak koštane gustine. Smanjenjem broja aktiviranih B ćelija, koje se nalaze u imunološkoj disfunkciji, smanjuje se i proizvodnja RANKL-a, a samim tim i koštana resorpcija [80]. *In vitro* studije sprovedene na zdravim miševima, su pokazale da smanjenje i nedostatak B limfocita dovodi do izražene osteopenije, na račun smanjenja nivoa osteoprotegerina u koštanoj srži koji proizvode B ćelije [82].

RANKL/OPG odnos u ispitivanoj grupi se nakon terapije povećao (0,082 vs. 0,089), dok se u kontrolnoj grupi smanjio (0,082 vs. 0,078), što govori u prilog intenzivnijeg koštanog remodelovanja, na račun koštane resorpcije u ispitivanoj grupi ( $p=0,96$ ). Navedeni rezultati nisu pokazali statističku značajnost. Ravnoteža između RANKL-a i OPG-a određuje stepen proliferacije i aktivnosti osteoklasta, a njihov odnos, RANKL/OPG odnos, predstavlja važnu determinantu resorpcije kostiju [209]. Jedna od retkih studija koja se bavila posthemioterapijskim gubitkom koštane gustine kod bolesnika sa NHL-om, studija Anargyrou i saradnika, takođe, nije prikazala statistički značajnu promenu RANKL/OPG odnosa kod ove grupe ispitanika ( $p = 0,739$ ). Sa druge strane, postoje brojne studije koje su ispitivale uticaj anti-CD20 antitela na RANKL/OPG odnos u populaciji bolesnika sa reumatoidnm artritismom (RA). Većina studija navodi da u ovoj grupu bolesnika rituksimab povoljno utiče na koštanu gustinu smanjujući RANKL/OPG odnos, inhibirajući osteoklastogenezu i smanjujući nivo sinovijalnih B- i T- ćelija, plazma ćelija i makrofaga, koje ekspimiraju RANKL na svojoj površini. Andreev i saradnici u svojoj studiji navode da anti-CD20 monoklonsko antitelo redukuje RANKL nivoe u sinoviji bolesnika sa RA [210-212].

Testirajući hipotezu o razlici u promeni nivoa koštanih biohemijskih markera i RANKL/OPG odnosa kod bolesnika lečenih standardnim hemioterapijskim protokolima u kombinaciji sa anti-CD20 monoklonskim antitelom, u poređenju sa kontrolnom grupom možemo zaključiti da najveći stepen promene, i jedini statistički značajan, ima amino-terminalni propeptid kolagena tip I – P1NP. Vrednost P1NP-a značajno manje raste kod kontrolne grupe ispitanika ( $p = 0,01$ ), što se može objasniti intenzivnijim koštanim remodelingom ispitivane grupe, koga karakteriše kako porast markera koštane resorpcije, tako i porast markera koštanog formiranja, dok sa druge možemo razmišljati i o protektivnom

efektu monoklonskog anti-CD20 antitela na koštanu gustinu kod bolesnika sa NHL-om. Dokazano je da B-limfociti mogu regulisati metabolizam kosti svojom sposobnošću da luče RANKL i OPG i da u zavisnosti od njihove aktivacije mogu inhibirati ili stimulisati osteoklastogenezu [83]. U fiziološkim uslovima B-limfociti proizvode 40% - 60% ukupnog osteoprotegerina i na taj način inhibiraju diferencijaciju osteoklasta. Sa druge strane, u patološkim i inflamatornim stanjima, dolazi do sekrecije RANKL-a od strane B-limfocita, čime se stimuliše osteoklastogeneza. Rituksimab se vezuje za B limfocite i uništava ih kroz nekoliko mehanizama, mehanizmom citotoksičnosti zavisne od komplemента, odnosno antitela, kao i procesom fagocitoze [213]. Primenom rituksimaba dolazi do uništenja patoloških B-limfocita, koji ekspimiraju CD20 antigen na površini, što za posledicu ima smanjenje lučenja RANKL-a, odnosno smanjenje diferencijacije, aktivacije i preživljavanja osteoklasta, što rezultira smanjenom resorpcijom kosti [96, 129]. Takođe, manji porast P1NP-a u kontrolnoj grupi kao markera koštanog formiranja, možemo objasniti i većom infiltracijom koštane srži u ovoj grupi ispitanika, koja za posledicu ima uništavanje strukture koštane srži i smanjenje broja mezenhimalnih stromalnih ćelija iz kojih nastaju osteoblasti [214,215]. Porast P1NP-a nakon primene rituksimaba, potvrdio je i Wheater u svojoj studiji. On je sa svojim saradnicima, ispitujući 46 bolesnika sa reumatoidnom artritismom, koji su tokom šest meseci primali rituksimab, dokazao signifikantan porast markera koštanog formiranja, P1NP-a ( $p=0,02$ ). Ovaj porast objašnjava kombinacijom smanjene osteoklastogeneze posredovane B-ćelijama, smanjenjem koncentracije sistemskih inflamatornih citokina i povećanom fizičkom aktivnošću bolesnika nakon primene rituksimaba [216].

Svaki ispitanik uključen u ovo istraživanje je nakon terapije smanjio koštanu gustinu na svim merenim poljima (lumbalna kičma, kuk, vrat butne kosti). Ukupno 12 ispitanika, odnosno 20% (8 žena i 4 muškaraca, 9 ispitivana grupa i 3 kontrolna grupa) je imalo dijagnostikovanu postterapijsku osteoporozu. Pre započinjanja terapije niko od ispitanika nije imao osteoporozu, dok je osteopeniju imalo 13 pripadnika ispitivane grupe, odnosno 10 ispitanika kontrolne grupe, ukupno 38,33% ispitanika ( $p<0,05$ ). Westin i saradnici prijavljuju inicijalnu osteopeniju kod 48% bolesnika sa NHL-om, dok je kod Thompsona, koji je u svoju studiju uključio 84 bolesnika sa NHL-om, taj procenat i veći i iznosi čak 56%. Za sada se ne zna tačan mehanizam nastanka inicijalnog gubitka koštane gustine kod NHL bolesnika, iako je Thompson detektovao hipovitaminozu D i nizak testosteron kod manjeg broja ispitanika u svojoj studiji za koje se zna da značajno utiču na smanjenje koštane gustine [164, 217]. U

našem istraživanju smo detektovali manji procenat osteopenije na početku lečenja u odnosu na literaturne podatke, verovatno iz razloga manjeg broja ispitanika uključenih u istraživanje, posebno manjeg broja ženskog pola, kod kojih, nakon 50. godine života postoji četiri puta veći rizik za osteoporozu i dvostruko veći rizik za razvoj osteopenije u odnosu na mušku populaciju [218]. Verifikovali smo osteoporozu kod 20% ispitanika nakon hemioterapije, što je manji procenat u odnosu na studiju sprovedenu od strane Mancusa, koji je uključio duplo manji broj ispitanika, ali i ispitanike lečene radioterapijom, koja, takođe utiče na smanjenje koštane gustine i razvoj postiradijacionih fraktura [159, 219].

Naši rezultati govore u prilog statističke značajnosti ( $h_i = 8.06$ ,  $p < 0,05$ ) u pogledu broja ispitanika kod kojih je dijagnostikovana osteoporozna nakon terapije. Veći broj ispitanika u grupi koja je primala, uz standardnu hemioterapiju i anti-CD20 monoklonsko antitelo, je nakon terapije razvilo osteoporozu (9 vs 3 ispitanika). Svakako da je gubitak koštane gustine i razvoj osteoporoze kod bolesnika koji primaju hemioterapiju multifaktorijalan, ali objašnjenje ove razlike u broju ispitanika, koji su razvili osteoporozu nakon terapije, možemo pronaći u inicijalnim karakteristikama grupa. Ispitivana grupa imala je veći procenat pripadnika ženskog pola, koje češće razvijaju osteoporozu (43,3% vs 33,3%), dok je sa druge strane imala niži BMI, za koji je dokazano da više vrednosti imaju protektivnu ulogu na razvoj osteoporoze [220]. Takođe, više ispitanika u ispitivanoj grupi lečeno je prema CHOP protokolu u odnosu na kontrolu (28 vs 20), što znači da je 8 ispitanika više, primilo doksorubicin, potentni antraciklin koji podstiče formiranje RANKL-a i sledstvenu osteoklastogenezu uz istovremeno smanjenje diferencijacije osteoblasta i indukciju njihove apoptoze [214, 221]. Etopozid, za koji je dokazano da, *in vitro*, značajno smanjuje parametre formiranja kosti uz smanjenje koštane gustine, je u okviru CHOEP protokola primilo 4 ispitanika u ispitivanoj grupi, dva više u odnosu na kontrolu, što je moguće dodatni faktor za razvoj osteoporoze u ovoj grupi ispitanika [222]. Da li je primena anti-CD20 monoklonskog antitela uticala na ovu razliku u broju ispitanika u pogledu razvoja osteoporoze, i na koji način, ne možemo tvrditi, jer do sada niko nije ispitivao isključivo ovo antitelo na ovoj populaciji bolesnika. Anargyrou tvrdi da primena hemioterapije u kombinaciji sa ili bez rituksimaba dovodi do smanjena koštane gustine kod NHL pacijenata, iako je u studiju bilo uključeno samo 2 ispitanika koja nisu lečena primenom anti CD20 monoklonskog antitela (51 vs 2 ispitanika) [85]. Iako se NHL kao hematološka bolest koja utiče na koštani metabolizam i koštanu gustinu ne spominje, postoje studije koje tvrde da neke hematološke bolesti mogu imati štetan uticaj na koštano tkivo. Promene u kostima su potvrđene kod bolesnika sa



sistemskom mastocitozom, monoklonskom gamapatijom, bolesti srpastih ćelija, hemofilijom i talasemijom, kao i kod bolesnika koji su podvrgnuti transplantaciji koštane srži [223]. Kada smo ispitivanu grupu podelili na agresivne i indolentne limfome, i uporedili ih međusobno i sa kontrolnom grupom nismo pronašli statističku značajnost prilikom komparacije osteodenzitometrijskih parametara nakon terapije. Nije postojala statistički značajna razlika ni prilikom komparacije promene osteodenzitometrijskih parametara između ispitanika sa difuznim B-krupnoćelijskim limfom, folikularnim limfomom i ispitanika kontrolne grupe. Iako ne postoje studije koje su upoređivale koštani metabolizam između agresivnih i indolentnih limfoma, postoje podaci koji sugerišu da kod agresivnijih tumora postoji veća aktivnost osteoklasta koji su odgovorni za katabolizam kostiju, odnosno koštanu resorpciju [224].

U obe grupe ispitanika došlo je do statistički značajnog smanjenja vrednosti T skora svih merenih polja nakon hemioterapije ( $p=0,00$ ). Vrednosti T skora kontrolne grupe bile su veće kako pre (LS 0,31, FN -0,48, TH 0,03 vs. LS -0,48, FN -0,59, TH -0,35), tako i nakon završenog lečenja (T skor LS -0,09, FN -0,94, TH -0,43 vs. T skor LS -0,83, FN -1,06, TH -0,73), što svakako prati rezultat manjeg broja ispitanika sa postterapijskom osteoporozom u kontrolnoj grupi ( $p<0,05$ ). Najveći gubitak koštane gustine zabeležen je na nivou vrata butne kosti i u ispitivanoj (79,6% promena u odnosu na preterapijske vrednosti), i u kontrolnoj grupi (95,8%). Nekoliko studija su takođe potvrdile drastičan gubitak koštane gustine nakon primene hemioterapije. Anargyrou i saradnici su pokazali statistički značajnu redukciju koštane gustine na svim nivoima kod 61-og novodijagnostikovanog bolesnika sa NHL-om lečenih konvencionalnom hemioterapijom [85]. Grupa francuskih autora, takođe, navodi gubitak koštane gustine kod novodijagnostikovanih bolesnika sa limfomom nakon godinu dana od započinjanja terapije [84]. Nedavna prospektivna studija Terposa i saradnika je pokazala signifikantno smanjenje koštane gustine na lumbalnoj kičmi (-57,7%) i na vratu butne kosti u ovoj populaciji bolesnika. (-20,2%) [167].

Naši rezultati pokazuju da postoje marginalne statističke razlike ( $p = 0,07$ ;  $p=0,08$ ) između kontrolne i ispitivane grupe u pogledu vrednosti koštane gustine, nakon terapije, u nivou lumbalne kičme. Ispitanici koji primaju monoklonsko anti-CD20 antitelo imaju nešto manju koštanu gustinu na ovom nivou u odnosu na ispitanike kontrolne grupe. Jedan od ciljeva našeg istraživanja bio je i taj, da utvrdimo da li se stepen promena koštane gustine razlikuje između grupa. Nije verifikovana statistička značajnost u stepenu promena koštane

gustine procenjene *Man-Witney-U* testom nakon šest meseci od inicijalne terapije između ispitivanih grupa ( $p>0,48$ ).

U odnosu na vrstu primenjenog hemioterapijskog protokola (R-CHOP/CHOP/CVP), u ukupnom uzorku ispitanika, postojale su statistički značajne razlike u RANKL-u ( $p=0,03$ ), OPG-u ( $p=0,05$ ) i P1NP-u ( $p=0,00$ ). Ispitanici koji su primili CVP protokol imali su najviše vrednosti RANKL-a, a najniže OPG-a i P1NP-a u odnosu na ispitanike koji su lečeni prema R-CHOP i CHOP protokolu. Ispitanici koji su primili R-CHOP protokol su imali najniže vrednosti RANKL-a, a najviše OPG-a i P1NP-a u odnosu na ispitanike lečene prema CVP-u i CHOP-u. Iako bi očekivali da ispitanici koji su primili antracikline, odnosno doksorubicin, imaju lošiju koštanu gustinu zbog već gore pomenutog štetnog efekta doksorubicina na kost, naši rezultati to ne pokazuju. Oni govore u prilog dominantne koštane izgradnje kod ispitanika lečenih R-CHOP protokolom, što može biti posledica protektivnog uticaja anti-CD20 monoklonskog antitela na koštani metabolizam i koštanu gustinu. Sa druge strane, lošiji koštani metabolizam koji su imali ispitanici lečeni CVP protokolom možemo objasniti starošću ispitanika. Najveći broj ispitanika kontrolne grupe koji su primili CVP je imao više od 70 godina, a poznato je da koštana gustina opada sa godinama starosti [206].

Za razliku od grčkih autora koji su dokazali da ispitanici koji su primili 8 ciklusa hemioterapije imaju značajno veću redukciju koštane gustine na nivou lumbalne kičme u odnosu na one koji su lečeni sa 6 ciklusa, mi tu tvrdnju, statistički, nismo potvrdili na našem uzorku ( $p=0,64$ ) [85]. Da veći broj primenjenih hemioterapijskih ciklusa uzrokuje veću koštanu razgradnju potvrđuju i više vrednosti biohemijskih parametara koštane resorpcije (RANKL-a i *CrossLaps*-a), uz niže vrednosti P1NP-a, glavnog markera koštanog formiranja. Nemamo jasno objašnjenje za više vrednosti OPG-a, markera koštanog formiranja, a nižu koštanu gustinu, kod ispitanika koji su primili 8 ciklusa hemioterapije, kod kojih bi se očekivale niže vrednosti ovog parametra. Istu diskrepancu opisuje i Mansour sa saradnicima ispitujući povezanost niske koštane gustine i RANKL/OPG sistema kod bolesnika sa nefrolitijazom. Oni smatraju da povećan nivo OPG-a u cirkulaciji kod bolesnika sa nefrolitijazom i smanjenom koštanom gustinom može biti kompenzatorni mehanizam protiv koštane resorpcije, odnosno deo sistemskog odgovora na inflamaciju kod nefrolitijaze [225]. Prema našim saznanjima, nismo pronašli slične rezultate u populaciji hematoloških bolesnika.

Na postizanje kompletne remisije, u ukupnom uzorku, statistički nije uticao nijedan parametar koji smo ispitivali, ni broj primenjenih hemioterapijskih ciklusa, pol, klinički stadijum bolesti, prisustvo ektranodalne bolesti niti vrednost BMI-a ( $p>0,20$ ). Starost

ispitanika je bila marginalno značajna ( $p = 0.09$ ), odnosno, stariji ispitanici su imali manju vjerovatnoću za postizanje kompletne remisije. Verujemo da su dobijeni ovakvi rezultati proistekli iz malog procenta ispitanika koji su postigli kompletnu remisiju, ukupno 25% ( $n = 15$ ) ispitanika, odnosno 36,6% ( $n = 22$ ) ispitanika sa parcijalnim odgovorom. Naši rezultati se razlikuju u odnosu na literaturne podatke koji govore u prilog postizanja kompletne remisije kod 30% - 50% agresivnih limfomoma, odnosno 55% indolentnih [226, 227]. Na manji procenat postignutih kompletnih remisija kod naših ispitanika, uticala je starost, s obzirom na to da je 60% ispitanika imalo više od 60 godina, kao i IV klinički stadijum, kao pokazatelj veličine tumorske mase, u kom je bilo 66,6% ispitanika. Oba parametra su dobro poznata kao nezavisni parametri prognoze i prediktori lošijeg ishoda bolesnika, te su inkorporirani u brojne prognozne modele (IPI, rIPI, NCCN-IPI, FLIPI, MALT-IPI). Velika švedska studija iz 2021. godine, koja je uključila 1169 ispitanika sa agresivnim tipom limfoma, potvrdila je da su godine života najvažniji prediktor preživljavanja kod bolesnika sa DBKL-om [228]. Što se tiče uticaja prognoznih indeksa na postizanje kompletne remisije potvrdili smo da postoji značajna negativna korelacija između postizanja kompletne remisije i prognoznih indeksa u slučaju difuznog B-krupnoćelijskog ćelijskog limfoma. Ispitanici sa višim vrednostima NCCN IPI, rIPI i IPI indeksa imaju manju šansu da postignu kompletan odgovor nakon lečenja. Navedene rezultate potvrđuju i brojne studije, koje pokazuju drastične razlike u preživljavanju i dužini remisije između najviših i najnižih kategorija prognoznih indeksa, za IPI (IPI 0/1: engl. *progression free survival* - PFS 87%, engl. *overall survival* - OS 91% vs IPI 4/5: PFS 50%, OS 59%), za rIPI (rIPI 0: PFS 94%, OS 94% vs. rIPI 3-5: PFS 53%, OS 55%) i za NCCN IPI (NCCN-IPI 0-1: PFS 96%, OS 91% vs NCCN-IPI 6-8: PFS 33%, OS 30%). Sve češće se rade istraživanja koja upoređuju navedena 3 prognozna indeksa. Ruppert i saradnici, koji su sproveli studiju na 2124 ispitanika sa DBKL-om, tvrde da NCCN-IPI skor pokazuje najbolje prognostičke kvalitete [57, 58, 229, 230]. S obzirom na to da su u grupi folikularnog limfoma 4 ispitanika postigla kompletan odgovor i da je u pojedinim prognoznim grupama bio jedan ispitanik, očekivali smo da kategorije FLIPI, FLIPI-2 i PRIMA-PI prognoznih indeksa, statistički, neće uticati na postizanje kompletne remisije u našem istraživanju. Iako mi, statistički, nismo potvrdili prognozni značaj FLIPI, FLIPI-2, PRIMA-PI indeksa i njihov uticaj na postizanje boljeg terapijskog odgovora, on svakako postoji, i to je dokazano u brojnim studijama. Kimbly i saradnici su na populaciji od 291 bolesnika sa FL, lečenih kombinacijom rituximab ± interferon potvrdili prognozni značaj PRIMA-PI indeksa, koji je uspešno izdvojio grupu visokorizičnih bolesnika koji su iskusili brz terapijski neuspeh

uz nisku stopu preživljavanja. Casulo u svojoj studiji navodi da su klinički prognozni markeri FLIPI i FLIPI-2 korisni za inicijalno stratifikovanje bolesnika sa FL-om, ali da oni sa druge strane, u svakodnevnoj kliničkoj praksi, ipak značajno ne utiču na izbor terapije. Aktuelno se proučavaju novi biološki i radiološki markeri zasnovani na PET-u koji će verovatno zameniti ili modifikovati ove kliničke indekse kako bi se preciznije stratifikovali bolesnici i identifikovali oni sa visokim rizicima za lošiji ishod [231, 232].

Kod naših ispitanika, vrednost laktat dehidrogenaze ( $p=0,04$ ) i feritina ( $p=0,01$ ), su statistički značajno uticale na postizanje kompletne remisije. Vrednost leukocita, limfocita, hemoglobina, trombocita, brzine sedimentacije, CRP, fibrinogena, beta 2 mikroglobulina, albumina i imunoglobulina G ( $p>0,20$ ) nisu pokazale statističku značajnost za postizanje kompletnog odgovora. Ispitanici sa nižim vrednostima LDH i feritina su češće postizali kompletnu remisiju. Odavno je poznato da viša vrednost LDH korelira sa lošijim ishodom bolesnika sa malignitetom, posebno hematološkim. Bez obzira na patohistološki tip limfoma, visoka vrednost LDH prilikom postavljanja dijagnoze limfoma odražava veću tumorsku masu, a samim tim predviđa manje povoljnu prognozu bolesnika. Serumska vrednost LDH veća od dvostruke gornje referentne vrednosti korelira sa povećanom incidencijom infiltracije centralnog nervnog sistema kod NHL bolesnika. Garcia i saradnici su otkrili da serumske vrednosti LDH  $> 320$  U/L imaju kritičan prognostički uticaj na postizanje kompletne remisije [233-235].

Feritin je, takođe, prepoznat kao prediktor loše prognoze kod bolesnika sa NHL-om, kod kojih nivoi feritina u serumu koreliraju sa aktivnošću bolesti. Zhang je, ispitujući vrednosti feritina kod hematoloških maligniteta, dokazao da se više vrednosti detektuju kod NHL bolesnika u relapsu i kod novodijagnostikovanih u odnosu na bolesnike u remisiji [236]. Grupa kineskih autora čak sugerise da bi dodavanje feritina IPI skoru, povećalo prognostičku vrednost ovog međunarodnog prognostičkog indeksa kod DBKL-a [237].

Ispitivajući korelaciju između prognoznih indeksa (IPI, RIPI, NCCN-IPI, FLIPI, FLIPI-2, PRIMA PI) i biohemijskih koštanih markera i koštane gustine, uvideli smo da postoji značajna negativna korelacija između NCCN-IPI prognoznog indeksa i koštane gustine merene na sva tri nivoa. Viša kategorija NCCN-IPI prognoznog indeksa korelirala je sa nižim T skorom na lumbalnoj kičmi, kuku i vratu butne kosti. Takođe, postojala je statistički značajna negativna korelacija između PRIMA-PI prognoznog indeksa i T skora na nivou lumbalne kičme ( $p= -.51^*$ ). Ispitanici sa višim vrednostima PRIMA-PI prognoznog indeksa su imali manju koštanu gustinu lumbalne kičme. U okviru NCCN-IPI indeksa,

kvantifikuju se starost bolesnika, vrednost laktat dehidrogenaze, ECOG PS, An Arbor klinički stadijum i prisustvo ekstrapodalne lokalizacije. Visoke vrednosti ovih varijabli, osim starosti i ECOG PS-a, oslikavaju agresivniju i uznapredovalu malignu bolest, koja je često praćena gubitkom koštane gustine. Gubitak koštane gustine u malignim bolestima, koje predstavljaju glavni faktor rizika za razvoj osteoporoze, multifaktorijalan je. Paccou je u svom istraživanju, ispitujući gubitak koštane gustine na populaciji NHL bolesnika, potvrdio korelaciju između viših vrednosti LDH-a i nižih vrednosti T skora na nivou lumbalne kičme [84,146]. PRIMA-PI indeks vrednuje samo dva parametra: infiltraciju koštane srži i beta 2 mikroglobulin. Vrednost beta 2 mikroglobulina iznad 3 mg/l svrstava bolesnika u najvišu kategoriju ovog prognosnog indeksa. Korelaciju koju smo dobili možemo objasniti efektima beta 2 mikroglobulina na osteoklastnu aktivnost. Nekoliko studija je, još pre 30 godina, potvrdilo da beta 2 mikroglobulin stimuliše osteoklastogenezu i sledstvenu koštanu resorpciju [238, 239].

Pokušali smo da sagledamo da li pojedine karakteristike ispitanika, kliničke karakteristike bolesti i serumske koncentracije albumina, LDH, jonizovanog Ca, vitamina D, PTH, holesterola i biohemijских markera koštanog metabolizma, kao i kumulativne doze kortikosteroida utiču na gubitak koštane gustine. LDH ( $p=0,04$ ) i *CrossLaps* ( $p=0,00$ ) su bili jedini statistički značajni parametri. Viši *CrossLaps* je povezan sa nižim T skorom na svim nivoima, što je svakako očekivan rezultat s obzirom na to da je *CrossLaps* najznačajniji marker koštane resorpcije. Pojedini autori tvrde da je *CrossLaps* senzitivniji marker u ranoj proceni stepena osteoporoze, kao i u praćenju efekata antiresorptivne terapije u odnosu na druge koštane biohemijske markere [240]. Na nivou kuka vrednost LDH bila je statistički značajna ( $p = 0,04$ ), a na nivou vrata butne kosti marginalno značajna ( $p = 0,09$ ). Manji LDH su imali ispitanici sa većom koštanom gustinom na ovim nivoima. Grupa korejskih autora tvrdi da RANKL, povećava i aktivira LDH, koja stimuliše mitohondrijalni respiratorni metabolizam, putem glikolize, olakšavajući formiranje zrelih osteoklasta [241].

Multivarijatnom regresionom analizom smo pokušali da utvrdimo koji su to potencijalni prediktori gubitka koštane gustine ispitivane grupe. Jedini prediktivni faktor bio je *CrossLaps*. Na gubitak koštane gustine na nivou lumbalne kičme ( $p = 0,02$ ), vrata butne kosti ( $p = 0,00$ ) i kuku ( $p = 0,00$ ) na početku lečenja, uticala je viša vrednost *CrossLaps*-a. Poznavajući process remodelovanja kosti, dobijeni prediktivni faktor za gubitak koštane gustine, povišene vrednosti *Crosslaps*-a su očekivane i njihov uticaj smo već ranije objasnili.

U kontrolnoj grupi starost ( $p=0,02$ ), vitamin D ( $p=0,02$ ), holesterol ( $p=0,01$ ;  $p=0,05$ ), i kumulativna doza kortikosteroida ( $p=0,01$ ,  $p=0,03$ ) (deljena prema kvadratu telesne

površine) su pokazali statističku značajnost. Na nivou lumbalne kičme ispitanici s višim holesterolom su imali manju koštanu gustinu ( $p = 0,01$ ). Brojne epidemiološke studije pokazuju da hiperlipidemija i hiperholesterolemija, utičući na razvoj kardiovaskularnih bolesti, podstiču koštanu resorpciju i povećavaju rizik od patoloških preloma. Pojedini autori tvrde da statini mogu blago povećati koštanu gustinu i smanjiti rizik od preloma [242-244]. Veći T skorovi na nivou vrata butne kosti su povezani sa mlađim uzrastom ( $p = 0,02$ ) i višim nivoom vitamina D ( $p = 0,02$ ), dok je na nivou kuka, veća koštana gustina negativno povezana sa holesterolom ( $p = 0,05$ ) i pozitivno (marginalno) sa vitaminom D ( $p = 0,09$ ). Odavno je poznato da deficijencija vitamina D, esencijalnog vitamina za koštanu homeostazu, čiji se deficit detektuje kod svakog sedmog čoveka na svetu, smanjuje koštanu gustinu, izaziva osteomalaciju i pogoršava osteoporozu [245]. De Martinis je ukazao da deficit vitamina D može dovesti i do razvoja drugih bolesti koje karakteriše narušeni koštani metabolizam, kao što su autoimune bolesti, inflamatorne bolesti creva, alergije, endokrinološke bolesti i hematološki maligniteti. Graklanov takođe navodi da je nizak nivo vitamina D u serumu povezan sa većim rizikom od razvoja NHL-a [223, 246].

Multivarijantnom regresionom analizom u kontrolnoj grupi izdvojio se holesterol, kao jedini potencijalni prediktor gubitka koštane gustine na nivou lumbalne kičme ( $p = 0,04$ ). Niže vrednosti holesterola značajno utiču na povećanje koštane gustine lumbalne kičme.

Jedino istraživanje, sprovedeno u grupi bolesnika sa NHL-om, koje je navelo prediktivne faktore za gubitak koštane gustine sprovedeno je od strane grupe francuskih naučnika. U njihovoj studiji, koja je obuhvatila 41-og ispitanika, prediktivni faktori za gubitak koštane gustine na nivou lumbalne kičme bio je ženski pol, viša LDH i niži klirens kreatinina; na nivou kuka: niži albumin i viši korigovani kalcijum u serumu, niža ALP i autologna transplantacija matičnih ćelija; na vratu butne kosti viši korigovani kalcijum i niža ALP [84]. Diskrepancu naših rezultata, u odnosu na rezultate francuske studije, možemo objasniti heterogenošću grupa i različitom veličinom ispitivanog uzorka.

S obzirom na to da su naši ispitanici primili statistički značajno različite doze kortikosteroida, a poznato je da su glikokortikoidi najčešći uzročnici sekundarne osteoporoze, želeli smo da uverimo da li primenjene kumulativne doze kortikosteroida (deljenje po kvadratu telesne površine ispitanika) utiču na gubitak koštane gustine u našem istraživanju [247]. Univarijantna korelaciona analiza ukazala je na postojanje značajnih negativnih korelacija između primljene doze kortikosteroida i koštane gustine na nivou vrata butne kosti i kuka i to samo kod kontrolne grupe ispitanika, odnosno ispitanika koji nisu primili

monoklonsko anti-CD20 antitelo. Veće doze kotrikosteroida su primili ispitanici kontrolne grupe sa manjom koštanom gustinom na nivou vrata butne kosti ( $p = 0,01$ ) i kuka ( $p = 0,03$ ). Zna se da glikokortikoidi podstiču koštanu resorpciju na nekoliko načina. Direktno, smanjenjem osteoblastogeneze, indukcijom apoptoze osteocita, koja je povezana sa gubitkom skeletne vaskularnosti, angiogenezom i povećanjem RANKL-a, čime se povećava diferencijacija i sazrevanje osteoklasta. Indirektan uticaj se ogleda u povećanjem izlučivanju kalcijuma putem bubrega i smanjenjem njegove reapsorpcije u crevima, što dovodi do razvoja sekundarnog hiperparatiroidizma [248]. Iako je ispitivana grupa primila statistički značajno više doze kortikosteroida u odnosu na kontrolnu grupu, primenjena doza ovih lekova koji su sastavni deo hemioterapijskih protokola u lečenju NHL-a, statistički nije uticala na koštanu gustinu u ovoj grupi ispitanika. Dobijene rezultate možda možemo povezati sa primenom anti-CD20 monoklonskog antitela, koje smanjenjem broja B-limfocita, smanjuje sekreciju RANKL-a, a samim tim i koštanu resorpciju. Da li objašnjenje leži možda u nekom drugom mehanizmu, odnosno drugoj interakciji primenjenih lekova pokazaće buduće studije.

Naše istraživanje imalo je i svoje nedostatke, koji se ogledaju prvenstveno u malom i ograničenom broju ispitanika, kao i u heterogenosti grupa, ako posmatramo patohistološki tip limfoma, za koje je poznato da mogu imati veoma različite kliničke i biološke osobine. Iako do sada, prema našim saznanjima, nije sprovedena nijedna studija koja je ispitivala isključivo uticaj anti-CD20 monoklonskog antitela na koštani metabolizam kod bolesnika sa NHL-om, smatramo da smo dokazivanjem statistički manjeg porasta PINP-a u kontrolnoj grupi dali osnova da verujemo da rituksimab može povoljno uticati na koštani metabolizam kod ovih bolesnika. Za navedenu tvrdnju neohodne su veće i homogenije studije, koje bi apostrofirale važnost ove teme i koje bi možda dale osnove za kreiranje internacionalnih kliničkih vodiča. Takođe, trebalo bi jasno definisati kriterijume za uključivanje ispitanika u studiju, s obzirom da ispitanici sa infiltracijom koštane srži već imaju poremećen koštani metabolizam i da oni nisu najbolji izbor kada je u pitanju ispitivanje koštanog metabolizma. Dalja istraživanja bi trebala imati duže vreme praćenja ispitanika, s obzirom da brzina promena biohemijskih koštanih markera nije vremenski srazmerna promenama koje se mogu verifikovati osteodenzimetrijskim pregledima. Apsolutno je neophodno utvrditi koji su to bolesnici sa NHL-om koji zahtevaju ispitivanje koštane gustine i koji su to ispitanici koji bi imali koristi od primene antiresorptivne terapije.

## VII ZAKLJUČCI

1. Ispitivanjem koštanog metabolizma, kod obe grupe ispitanika, primenom osteodenzitometrijske metode, ustanovili smo da postoji statistički značajno manji BMD i T skor lumbalne kičme, kuka i vrata butne kosti šest meseci nakon započinjanja imuno±hemioterapijskog lečenja.
2. Nije postojala statistički značajna razlika u stepenu promena vrednosti BMD-a i T skora između ispitivanih grupa.
3. Posle šest meseci od započinjanja terapije osnovne bolesti, dokazano je statistički značajno povećanje markera koštane sinteze – P1NP-a u obe grupe ispitanika. Veći porast vrednosti biohemijskog markera koštane sinteze – P1NP-a je detektovan u grupi ispitanika koja je primila anti-CD20 monoklonsko antitelo.
4. Primena imunochemioterapije (RCHOP) statistički značajno utiče na povećanje vrednosti markera koštane sinteze – OPG-a i P1NP-a u odnosu na primenjen CHOP i CVP protokol.
5. Jedini prediktor za gubitak koštane gustine u ispitivanoj grupi je vrednost *CrossLaps*-a i vrednost LDH, dok se u kontrolnoj grupi kao jedini prediktorni faktor izdvojila vrednost holesterola.
6. Značaj naše studije se ogleda u kliničkoj potvrdi negativog uticaja polihemioterapije na koštani metabolizam i koštano gustinu kod naših ispitanika, dok sa druge strane možemo verovati da je u ispitivanoj grupi anti-CD20 monoklonsko antitelo imalo određeni protektivni efekat na koštano tkivo, s obzirom na povećanje vrednosti markera koštane sinteze – OPG-a i P1NP-a. Takođe, podaci iz našeg istraživanja ukazuju da je veoma važno testirati i detektovati NHL bolesnike sa inicijalno sniženom koštano gustinom, ali i na neophodnost njihovog praćenja u dužem vremenskom periodu nakon primenjene terapije, kako bi se pravovremenim uključivanjem profilaktičke antiresorptivne terapije smanjile negativne posledice na koštano tkivo.



## VIII LITERATURA

1. Armitage JO, Gascoyne RD, Lunning MA, et al. Non-Hodgkin lymphoma. *The Lancet*. 2017;390(10091):298-310.
2. Boffetta P. Epidemiology of adult non-Hodgkin lymphoma. *Annals of Oncology*. 2011;22(4):27-31.
3. Sedeta E, Ilerhunmwuwa H, Wasifuddin M, et al. Epidemiology of Non-Hodgkin Lymphoma: Global Patterns of Incidence, Mortality, and Trends. *Blood*. 2022;140(1):5234-5.
4. Tadmor T, Liphshitz I, Silverman B, et al. Incidence and epidemiology of non-Hodgkin lymphoma and risk of second malignancy among 22 466 survivors in Israel with 30 years of follow-up. *Hematol Oncol*. 2016;35(4):599-607.
5. Devi AA, Sharma TD, Singh YI, et al. Clinicopathological profile of patients with non-hodgkin's lymphoma at a regional cancer center in Northeast India. *J Sci Soc* 2017;44:140-4.
6. Horesh N, Horowitz NA. Does Gender Matter in Non-Hodgkin Lymphoma? Differences in Epidemiology, Clinical Behavior, and Therapy. *Rambam Maimonides Med J*. 2014;5(4):e0038.
7. Serbia - Global Cancer Observatory [homepage on the Internet]. International Agency for Research on Cancer [cited 2019 Januar 9]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/688-serbia-fact-sheets.pdf>.
8. Miranda – Filho A, Pineros M, Znaor A, et al. Global patterns and trends in the incidence of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Causes Control*. 2019;30(5):489-99.
9. Prescott J, Lu Y, Chang ET, et al. Reproductive Factors and Non-Hodgkin Lymphoma Risk in the California Teachers Study. *Plos One* 2009; 4(12):e8135.
10. Perry AM, Diebold J, Nathwani BN, et al. Non-Hodgkin lymphoma in the developing world: review of 4539 cases from the International Non-Hodgkin Lymphoma Classification Project. *Haematologica*. 2016;101(10):1244-50.
11. Zhang Y, Dai Y, Zheng T, et al. Risk Factors of Non-Hodgkin Lymphoma. *Expert Opin Med Diagn*. 2011;5(6):539-50.
12. Chiu BC, Hou N. Epidemiology and etiology of non-hodgkin lymphoma. *Cancer Treat Res*. 2015;165:1-25.
13. Martel de C, Franceschi S. Infections and cancer: Established associations and new hypotheses. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009;70(3):183-94.

14. Leeuwen van MT, Grulich AE, Webster AC, et al. Immunosuppression and other risk factors for early and late non-Hodgkin lymphoma after kidney transplantation. *Blood*. 2009;114(3):630-7.
15. Na R, Laaksonen MA, Grulich AE, et al. Iatrogenic immunosuppression and risk of non-Hodgkin lymphoma in solid organ transplantation: A population-based cohort study in Australia. *Br J Haematol*. 2016;174(4):550-62.
16. Gibson TM, Morton LM, Shiels MS, et al. Risk of non-Hodgkin lymphoma subtypes in HIV-infected people during the HAART era: a population-based study. *AIDS*. 2014;28(15):2313-8.
17. Pei Y, Lewis AE, Robertson ES. Current Progress in EBV-Associated B-Cell Lymphomas. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1018:57-74.
18. Rabkin CS, Ward MH, Manns A, et al. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphomas. The non-Hodgkin's lymphoma. 2nd ed. Magrath IT, editor. New York:Oxford University Press; 1997:171-86.
19. Re A, Cattaneo C, Rossi G. HIV and Lymphoma: from Epidemiology to Clinical Management. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2019;11(1):e2019004.
20. Engels EA. Infectious Agents as Causes of Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(3):401-4.
21. Khaled H, Abu-Taleb F, Haggag R. Hepatitis C virus and non-Hodgkin's lymphomas: A mini review. *J Adv Res*. 2017;8(2):131-7
22. Perrone S, D'Elia GM, Annechini G, et al. Infectious Aetiology of Marginal Zone Lymphoma and Role of Anti-Infective Therapy. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2016;8(1):e2016006.
23. Bassig BA, Lan Q, Rothman N, et al. Current Understanding of Lifestyle and Environmental Factors and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma: An Epidemiological Update. *J Cancer Epidemiol*. 2012; 2012:978930.
24. Ali A, Al-Belushi BS, Waly MI, et al. Dietary and lifestyle factors and risk of non-hodgkin's lymphoma in Oman. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(2):841-8.
25. Geyer SM, Morton LM, Habermann TM, et al. Alcohol Use, Obesity, and Overall Survival from Non-Hodgkin Lymphoma: A Population-Based Study. *Cancer*. 2010;116(12):2993-3000.
26. Brown JR, Arnold FS. Overview of the pathobiology of the non-Hodgkin lymphomas. 2014. [cited 2019 March 12]. Available from: <https://www.medilib.ir/uptodate/show/4711>

27. Küppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(4):251-62.
28. Bhattacharya M. Understanding B Lymphocyte Development: A Long Way to Go. In: Salih Istifli E, Basri İla H, editors. *Lymphocytes*. 2019; [cited 2021 April 15]. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.73716>.
29. Urbanczyk S, Stein M, Schuh W, et al. Regulation of Energy Metabolism during Early B Lymphocyte Development. *Int J Mol Sci*. 2018;19(8):2192.
30. Cambier JC, Gauld SB, Merrell KT, et al. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat Rev Immunol*. 2007;7(8):633-43.
31. Küppers R, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular Origin of Human B-cell Lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, 1999;341:1520-9.
32. Yam-Puc JC, Zhang L, Zhang Y, et al. Role of B-cell receptors for B-cell development and antigen-induced differentiation. *F1000Res*. 2018;7:429.
33. Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 2012;380(9844):848-57.
34. Fichtner M, Dreyling M, Binder M, et al. The role of B cell antigen receptors in mantle cell lymphoma. *J Hematol Oncol*. 2017;10:164.
35. Inamdar AA, Goy A, Ayoub NM, et al. Mantle cell lymphoma in the era of precision medicine-diagnosis, biomarkers and therapeutic agents *Oncotarget*. 2016;7(30):48692-731.
36. Le Bien TW, Tedder TF. B-lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008;112:1570-80.
37. Takemori T, Tarlinton D, Hiepe F, et al. B Cell Memory and Plasma Cell Development. *Molecular Biology of B Cells*, 2015;227-49.
38. Soh KT, Tario JD, Wallace PK. Diagnosis of Plasma Cell Dyscrasias and Monitoring of Minimal Residual Disease by Multiparametric Flow Cytometry. *Clin Lab Med*. 2017;37(4):821-53.
39. Nogai H, Dörken B, Lenz G. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2011;29(14):1803-11.
40. Bulduk T, Gunduz E, Aras B, et al. Genetic Abnormalities Detected in Non-Hodgkin Lymphoma. *EJMI* 2021;5(2):283-8.
41. Esmeray E, Küçük C. Genetic alterations in B cell lymphoma subtypes as potential biomarkers for noninvasive diagnosis, prognosis, therapy, and disease monitoring. *Turk J Biol*. 2020;44:1-14.

42. Jaffe ES, Raffeld M, Medeiros JL, et al. An Overview of the Classification of Non-Hodgkin's Lymphomas: An Integration of Morphological and Phenotypical Concepts. *Cancer research*. 1992;52:5447-52.
43. Skarin AT, Dorfman DM. Non-Hodgkin's lymphomas: current classification and management. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 1997; 47(6): 351-72.
44. Hossfeld DK, Jaffe ES, Harris NL, et al. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. *Annals of Oncology*. 2002;13(3): 490-1.
45. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1720-48.
46. Freedman AS, Jacobson CA, Mauch P et al. Non-Hodgkin's lymphoma. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 10th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 2015. Chapter 103.
47. Pejin D, urednik. *Interna medicina*. Medicinski fakultet, Novi Sad, 2006.
48. Hingorjo MR, Syed S. Presentation, staging and diagnosis of lymphoma: a clinical perspective. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2008; 20(4):100-3.
49. Liu J, Zheng Z, Wu Q, et al. Case report extra-nodal lymphoma presenting as an abdominal wall mass: a case report. *Int J Clin Exp Med*. 2017;10(11):15532-7.
50. Dehghani M, Haddadi S, Vojdani R. Signs, Symptoms and Complications of Non-Hodgkin's Lymphoma According to Grade and Stage in South Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(8): 3551-7.
51. Shirwaikar TA, Schwartz M, Quigle E. Gastrointestinal lymphoma: the new mimic. *BMJ Open Gastroenterol*. 2019; 6(1):e000320.
52. Heimann P, Poirel HA. Cytogenetic and molecular testing in lymphoma patients Part 1: (Cyto)genetic methods, B- and T-cell clonalities and aberrations in mature B-cell lymphomas. *Belg j hematol* 2018;9(6):225-36.
53. Kumar S, Rau AR, Naik R, et al. Bone marrow biopsy in non-Hodgkin lymphoma: a morphological study. *Indian J Pathol Microbiol*. 2009;52(3):332-8.
54. El-Galaly TC, Villa D, Gormsen LC, et al. FDG-PET/CT in the management of lymphomas: current status and future directions. *J Intern Med*. 2018;284(4):358-76.

55. Matasar MJ, Zelenetz AD. Overview of Lymphoma Diagnosis and Management. *Radiol Clin North Am.* 2008; 46(2):175-98.
56. PDQ Adult Treatment Editorial Board. Non-Hodgkin Lymphoma Treatment (PDQ®): Health Professional Version. 2023 Feb 17. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002.
57. International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 1993; 329(14):987-94.
58. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood.* 2007;109(5):1857-61.
59. Solal-Céligny P, Roy P, Colombat P, et al. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 2004;104:1258-65.
60. Federico M, Bellei M, Marcheselli L, et al. Follicular Lymphoma International Prognostic Index 2: A New Prognostic Index for Follicular Lymphoma Developed by the International Follicular Lymphoma Prognostic Factor Project. *J Clin Oncol.* 2009;27(27):4555-62.
61. Thieblemont C, Cascione L, Conconi A, et al. A MALT lymphoma prognostic index. *Blood.* 2017;130:1409-17.
62. Hoster E, Dreyling M, Klapper W, et al. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood.* 2008;111:558-65.
63. Mantle Cell Lymphoma Prognostic Index (MIPI) Score [homepage on the Internet]. [cited 2019 December 27]. Available from: <https://www.mdapp.co/mantle-cell-lymphoma-prognostic-index-mipi-score-calculator-343/>
64. Hoster E, Rosenwald A, Berger F, et al. Prognostic value of Ki-67 index, cytology, and growth pattern in mantle-cell lymphoma: results from randomized trials of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *J Clin Oncol.* 2016;34:1386-94.
65. Morel P, Duhamel A, Gobbi P, et al. International prognostic scoring system for Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 2009; 113:4163-70.
66. Sapkota S, Shaikh H. Non-Hodgkin Lymphoma. [Updated 2022 Dec 2]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-.
67. Dotan E, Aggarwal C, Smith MR. Impact of Rituximab (Rituxan) on the Treatment of B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *P T.* 2010;35(3):148-57.

68. Habermann T, Weller E, Morrison V, et al. Rituximab-CHOP Versus CHOP Alone or With Maintenance Rituximab in Older Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 2006;24:3121-7.
69. Pfreundschuh M, Kuhnt E, Trümper L, et al. CHOP-like chemotherapy with or without rituximab in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: 6-year results of an open-label randomised study of the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet* 2011;12(11):1013-22.
70. Imber BS, Yahalom J. Radiotherapy for Non-Hodgkin Lymphomas. *Cancer J*. 2020;26(3):217-30.
71. Crisci S, Di Francia R, Mele S et al. Overview of Targeted Drugs for Mature B-Cell Non-hodgkin Lymphomas. *Front Oncol*. 2019;9:443.
72. St-Pierre F, Gordon LI. CAR T-Cell Therapy for Relapsed/ Refractory Non-Hodgkin's Lymphoma: A Comprehensive Review. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2022;20(5):309-18.
73. Cancer.org [homepage on the Internet]. Survival Rates and Factors That Affect Prognosis (Outlook) for Non-Hodgkin Lymphoma [cited 2020 February 15]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/non-hodgkin-lymphoma/detection-diagnosis-staging/factors-prognosis.html>
74. Kumar S, Sharma A, Pramanik R, et al. Long-Term Outcomes and Safety Trends of Autologous Stem-Cell Transplantation in Non-Hodgkin Lymphoma: A Report From A Tertiary Care Center in India. *JCO Glob Oncol*. 2022;8:e2100383.
75. Bryson, Michelle. The role of chemokines and their receptors in non-Hodgkin's lymphoma. PhD thesis, University of Glasgow; 2011.
76. Berzaczy D, Haug A, Staber PB, et al. RECIL versus Lugano for Treatment Response Assessment in FDG-Avid Non-Hodgkin Lymphomas: A Head-to-Head Comparison in 54 Patients. *Cancers (Basel)*. 2019;12(1):9.
77. Younes A, Hilden P, Coiffier B, et al. International Working Group consensus response evaluation criteria in lymphoma (RECIL 2017). *Ann Oncol*. 2017;28(7):1436-47.
78. Hanif N, Anwer F. Rituximab. [Updated 2022 Sep 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-.
79. Feugier P. A review of rituximab, the first anti-CD20 monoclonal antibody used in the treatment of B non-Hodgkin's lymphomas. *Future Oncol*, 2015;11(9):1327-42.

80. Al Khayyat SG, Falsetti P, Conticini E, et al. Bone-sparing effects of rituximab and body composition analysis in a cohort of postmenopausal women affected by rheumatoid arthritis - retrospective study. *Reumatologia*. 2021;59(4):206-10.
81. Wheeler G, Elshahaly M, Naraghi K, et al. Changes in bone density and bone turnover in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab, results from an exploratory, prospective study. *PLOS ONE*, 2018; 13(8): e0201527.
82. Elshahaly M, Wheeler G, Naraghi K et al. Changes in bone density and bone turnover in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab, a B cell depleting monoclonal antibody (HORUS TRIAL). *BMC Musculoskelet Disord*. 2013;14(1):A10.
83. Kolomansky A, Kaye I, Ben-Califa N, et al. Anti-CD20-Mediated B Cell Depletion Is Associated With Bone Preservation in Lymphoma Patients and Bone Mass Increase in Mice. *Front Immunol*. 2020;11:561294.
84. Paccou J, Merlusca L, Henry-Desailly I, et al. Alterations in bone mineral density and bone turnover markers in newly diagnosed adults with lymphoma receiving chemotherapy: a 1-year prospective pilot study. *Ann Oncol*. 2014;25(2):481–486.
85. Anargyrou K, Fotiou D, Vassilakopoulos TP, et al. Low Bone Mineral Density and High Bone Turnover in Patients With Non-Hodgkin's Lymphoma (NHL) Who Receive Frontline Therapy: Results of a Multicenter Prospective Study. *Hemasphere*. 2019;3(6):e303.
86. Mohamed AM. An Overview of Bone Cells and their Regulating Factors of Differentiation. *Malays J Med Sci*. 2008;15(1):4-12.
87. Matić, I. Uloga neuropeptida Y (NPY) u diferencijaciji osteoblasta. Doktorska disertacija, University of Zagreb, Faculty of Science; 2013.
88. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone Remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 1092(1): 385–96.
89. Harrison's Principles of Internal Medicine. New York :McGraw-Hill, Health Professions Division, 1998.
90. Kenkre JS, Bassett J. The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem*. 2018;55(3):308-327.
91. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology*, 2016;31(3), 233-45.
92. Schiellerup SP, Skov-Jepesen K, Windeløv JA, et al. Gut Hormones and Their Effect on Bone Metabolism. Potential Drug Therapies in Future Osteoporosis Treatment. *Frontiers in Endocrinology*, 2019;10:75.

93. Ičin T. Efekat antiresorptivne terapije osteoporoze na metaboličku aktivnost kosti. Doktorska disertacija. Medicinski Fakultet, Novi Sad; 2012.
94. Maeda K, Yoshida K, Nishizawa T, et al. Inflammation and Bone Metabolism in Rheumatoid Arthritis: Molecular Mechanisms of Joint Destruction and Pharmacological Treatments. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23:2871.
95. Yu J, Choi S, Kim H, et al. Generation of an osteoblast-based artificial niche that supports in vitro B lymphopoiesis. *Exp Mol Med.* 2017;49(11), e400.
96. Fischer V, Haffner-Luntzer M. Interaction between bone and immune cells: Implications for postmenopausal osteoporosis. *Semin Cell Dev Biol.* 2022;123:14-21.
97. Hu C, Qin Q. Bone remodeling and biological effects of mechanical stimulus. *AIMS Bioengineering*, 2020;7(1):12–28.
98. Ponzetti M, Rucci N. Updates on Osteoimmunology: What's New on the Cross-Talk between Bone and Immune system. *Front. Endocrinol.* 2019;10:236.
99. Coşkun Benlidayı İ. The osteocyte as a director of bone metabolism. *Arch Rheumatol* 2021;36(4):617-619.
100. Goldring SR. The osteocyte: key player in regulating bone turnover. *RMD Open* 2015;1:e000049.
101. Rowe P, Koller A, Sharma S. Physiology, Bone Remodeling. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; January 27, 2022.
102. Sato M, Asada N, Kawano Y, et al. Osteocytes regulate primary lymphoid organs and fat metabolism. *Cell Metab.* 2013;18:749-58.
103. Melmed S. Osteoporosis: Basic and Clinical Aspects. *Williams Textbook of Endocrinology*, 2020. p. 1256-97.
- Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer*. New York: McGrawHill; 2002. p. 93-113.
104. Chao Hu, Qing-Hua Qin. Bone remodeling and biological effects of mechanical stimulus[J]. *AIMS Bioengineering*, 2020, 7(1): 12-28.
105. Janković T. Uticaj terapije inhibitora faktora tumorske nekroze na mineralnu koštanu gustinu i koštane biohemijske markere-prokolagen tip 1n-terminalni propeptid i beta-crosslaps kod bolesnica sa reumatoidnim artritism. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet, Novi Sad; 2019.



106. Ilić J, Kovačev B, Babić Lj, et al. Effects of alendronate on the markers of bone metabolic activity in postmenopausal women with osteoporosis. *Medicinski pregled*. 2005;58(7-8):393-9.
107. Endocrinology.testcatalog.org. [homepage on the Internet]. Mayo Clinic Laboratories Endocrinology Test Catalog [cited 2021 Jul 15]. Available from: <https://endocrinology.testcatalog.org/show/PINP>
108. Lorentzon M, Branco J, Brandi ML, et al. Algorithm for the Use of Biochemical Markers of Bone Turnover in the Diagnosis, Assessment and Follow-Up of Treatment for Osteoporosis *Adv Ther*. 2019; 36(10): 2811-24.
109. Rankov O. Procena rizika za koštane prelome kod žena sa postmenopauznom osteoporozom. Doktorska disertacija. Medicinski Fakultet Novi Sad, 2021.
110. Endocrinology.testcatalog.org. [homepage on the Internet]. Mayo Clinic Laboratories Endocrinology Test Catalog [cited 2021 Jul 15]. Available from: <https://endocrinology.testcatalog.org/show/CTX>
111. Kuo TR, Chen CH. Bone biomarker for the clinical assessment of osteoporosis: recent developments and future perspectives. *Biomark Res*. 2017;5:18.
112. Arrieta F, Iglesias P, Piñera M, et al. Serum Concentrations of Osteocalcin (OC) and Beta-Cross Laps (Beta-CTx) and Insulin Resistance in Morbid Obese Women with and without DM2. *Glob J Obes Diabetes Metab Syndr*. 2017;4(3):072-6.
113. Glasnović A, O'Mara N, Kovačić N, et al. RANK/RANKL/OPG Signaling in the Brain: A Systematic Review of the Literature. *Front Neurol*. 2020;11:590480.
114. Sisay M, Mengistu G, Edessa D. The RANK/RANKL/OPG system in tumorigenesis and metastasis of cancer stem cell: potential targets for anticancer therapy. *Onco Targets and Ther*. 2017;10:3801-10.
115. Liu W, Zhang X. Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (review). *Mol Med Rep*. 2015;11(5):3212-3218.
116. Rochette L, Meloux A, Rigal E, et al. The Role of Osteoprotegerin in Vascular Calcification and Bone Metabolism: The Basis for Developing New Therapeutics. *Calcified Tissue International*. 2019 Sep;105(3):239-251.
117. Wang Y, Liu Y, Huang Z, et al. The roles of osteoprotegerin in cancer, far beyond a bone player. *Cell Death Discov*. 2022;8:252

118. Anđelkovic Z, Osteoprotegerin: A neutralizing receptor, protector of bones and a potential antiresorptive agent. *Medicinski preglod*. 2005 LVIII (7-8)362-7
119. Hart K. RANKL and Osteoprotegerin Levels in Response to Orthodontic Forces. PhD Theses. University of Tennessee Health Science Center, 2012.
120. Baud'huin M, Duplomb L, Teletchea S, et al. Osteoprotegerin: multiple partners for multiple functions. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013;24(5):401-9.
121. Bernardi S, Bossi F, Toffoli B, et al. Roles and Clinical Applications of OPG and TRAIL as Biomarkers in Cardiovascular Disease. *Biomed Res Int*. 2016;2016:1752854.
122. Nabipour I, Kalantarhormozi M, Larijani B, et al. Osteoprotegerin in relation to type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Metabolism*. 2010;59(5):742-7.
123. Yano K, Shibata O, Mizuno A, et al. Immunological study on circulating murine osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor (OPG/OCIF): possible role of OPG/OCIF in the prevention of osteoporosis in pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;288(1):217-224.
124. Yun TJ, Tallquist MD, Aicher A, et al. Osteoprotegerin, a Crucial Regulator of Bone Metabolism, Also Regulates B Cell Development and Function. *J Immunol*. 2001;166(3):1482-91.
125. Schoppet M. RANK Ligand and Osteoprotegerin: Paracrine Regulators of Bone Metabolism and Vascular Function. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2002;22(4):549-53.
126. Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol*. 2014;5:511.
127. Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K. CLINICAL Review: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(12):4514-21.
128. Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, et al. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology*. 2001;142(4):1419-26.
129. Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, Marshall MJ. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2009;2(1):56-64.
130. Ono T, Hayashi M, Sasaki F, Nakashima T. RANKL biology: bone metabolism, the immune system, and beyond. *Inflamm Regen*. 2020;40:2.

131. Xiong J, Cawley K, Piemontese M. et al. Soluble RANKL contributes to osteoclast formation in adult mice but not ovariectomy-induced bone loss. *Nat Commun.* 2018;9(1):2909.
132. Tat SK, Pelletier JP, Lajeunesse D, et al. Differential modulation of RANKL isoforms by human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts: influence of osteotropic factors. *Bone.* 2008;43(2):284-91.
133. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 2008;473(2):139-46.
134. Renema N, Navet B, Heymann MF, et al. RANK-RANKL signalling in cancer. *Biosci Rep.* 2016;36(4):e00366.
135. Tobeiha M, Moghadasian MH, Amin N, et al. RANKL/RANK/OPG Pathway: A Mechanism Involved in Exercise-Induced Bone Remodeling. *Biomed Res Int.* 2020;2020:6910312.
136. Kohli SS, Kohli VS. Role of RANKL-RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications. *Indian J Endocrinol Metab.* 2011;15(3):175-81.
137. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature.* 1997;390(6656):175-9.
138. Schramek D, Penninger JM. The many roles of RANKL-RANK signaling in bone, breast and cancer. *IBMS Bonekey* 2011;8(5):237-56.
139. Seshasayee D, Wang H, Lee WP, et al. A novel in vivo role for osteoprotegerin ligand in activation of monocyte effector function and inflammatory response. *J Biol Chem.* 2004;279(29):30202-9.
140. Hanada R, Leibbrandt A, Hanada T, et al. Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. *Nature.* 2009;462(7272):505-9.
141. Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, Elliott R, Scully S, Voura EB, Lacey DL, Boyle WJ, Khokha R, Penninger JM (Sep 29, 2000). "The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development". *Cell.* 103 (1): 41–50.
142. yant G. Darnay,\* Arnaud Besse, Ann T. Poblenz, Betty Lamothe and Jorg J. Jacoby. TRAFs in RANK signaling. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 597:152-9

143. Hofbauer, Lorenz C.; Heufelder, Armin E. (3 May 2001). "Role of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology". *Journal of Molecular Medicine*. 79 (5–6): 243–253.
144. Ney, J.; Fehm, T.; Juhasz-Boess, I.; Solomayer, E. (2012). RANK, RANKL and OPG Expression in Breast Cancer - Influence on Osseous Metastasis. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 72(5), 385–391
145. Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM. Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today*. 2000;21(10):495-502.
146. Drake MT. Osteoporosis and Cancer. *Curr Osteoporos Rep*. 2013;11(3):163-70.
147. Whitburn J, Edwards CM. Metabolism in the Tumour-Bone Microenvironment. *Curr Osteoporos Rep*. 2021;19(5):494-9.
148. Sturgeon KM, Mathis KM, Rogers CJ, et al. Cancer- and Chemotherapy-Induced Musculoskeletal Degradation. *JBMR Plus*. 2019;3(3):e10187.
149. D'Oronzo S, Stucci S, Tucci M, et al. Cancer treatment-induced bone loss (CTIBL): pathogenesis and clinical implications. *Cancer Treat Rev*. 2015;41(9):798-808.
150. Nishio K, Tanabe A, Maruoka R, et al. Bone mineral loss induced by anticancer treatment for gynecological malignancies in premenopausal women. *Endocr Connect*. 2012;2(1):11-7.
151. Wissing MD. Chemotherapy- and irradiation-induced bone loss in adults with solid tumors. *Curr Osteoporos Rep*. 2015;13(3):140-5.
152. Ramin C, May BJ, Roden RBS, et al. Evaluation of osteopenia and osteoporosis in younger breast cancer survivors compared with cancer-free women: a prospective cohort study. *Breast Cancer Res*. 2018;20(1):134.
153. Todenhöfer T, Stenzl A, Hofbauer LC, Rachner TD. Targeting bone metabolism in patients with advanced prostate cancer: current options and controversies. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:838202.
154. Kim TJ, Koo KC. Pathophysiology of Bone Loss in Patients with Prostate Cancer Receiving Androgen-Deprivation Therapy and Lifestyle Modifications for the Management of Bone Health: A Comprehensive Review. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6):1529.
155. Jin HY, Lee JA. Low bone mineral density in children and adolescents with cancer. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2020;25(3):137-44.
156. Wilson CL, Ness KK. Bone mineral density deficits and fractures in survivors of childhood cancer. *Curr Osteoporos Rep*. 2013;11(4):329-37.

157. Mostoufi-Moab S, Ward LM. Skeletal Morbidity in Children and Adolescents during and following Cancer Therapy. *Horm Res Paediatr.* 2019;91(2):137-51.
158. Toret E, Dural B, Kar YD, et al. Evaluating Bone Mineral Density in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Survivors: A Tertiary Care Hospital Experience. *Int J Blood Res Disord.* 2021;8:065.
159. Mancuso S, Scaturro D, Santoro M, et al. Bone damage after chemotherapy for lymphoma: a real-world experience. *BMC Musculoskelet Disord.* 2021;22(1):1024.
160. Ruchlemer R, Amit-Kohn M, Tvito A, et al. Bone loss and hematological malignancies in adults: a pilot study. *Support Care Cancer.* 2018;26(9):3013-20.
161. Gaudio A, Xourafa A, Rapisarda R, et al. Hematological Diseases and Osteoporosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(10):3538.
162. Qian X, editor. Glucocorticoids - New Recognition of Our Familiar Friend. 2012 Nov 28; Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/2915>
163. Pfeilschifter J, Diel IJ. Osteoporosis due to cancer treatment: pathogenesis and management. *J Clin Oncol.* 2000;18:1570-93.
164. Thompson MA, Huen A, Toth BB, et al. Osteopenia and osteoporosis in untreated non-Hodgkin's lymphoma patients: an important and potentially treatable survivorship issue in lymphoma. *J Clin Oncol.* 2007;25:9055.
165. Sözen T, Özışık L, Başaran NÇ. An overview and management of osteoporosis. *Eur J Rheumatol.* 2017;4(1):46-56.
166. Westin JR, Thompson MA, Cataldo VD, et al. Zoledronic acid for prevention of bone loss in patients receiving primary therapy for lymphomas: a prospective, randomized controlled phase III trial. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2013;13(2):99-105.
167. Terpos E, Fotiou D, Anargyrou K, et al. Bone Loss and High Bone Turnover in Patients with Non-Hodgkin's Lymphoma Who Receive Frontline Chemotherapy: Final Results of a Multicenter Prospective Study. *Blood.* 2019;134(1):4124.
168. Cohen B, Hiller N, Szalat A, et al. Opportunistic evaluation of bone mineral density by pet-ct in hodgkin lymphoma patients. *Endocr Pract.* 2019;25(9):869-76.
169. Bodden J, Sun D, Joseph GB, et al. Identification of non-Hodgkin lymphoma patients at risk for treatment-related vertebral density loss and fractures. *Osteoporos Int.* 2021;32(2):281-91.
170. Tilly H, Gomes da Silva M, Vitolo U, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.*

2015;26(5):v116-v125.

171. Dreyling M, Ghielmini M, Rule S, et al. Newly Diagnosed and Relapsed Follicular Lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2020;32:298-308.

172. NCCN Guidelines for B-Cell Lymphomas V.5.2022. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) cyted 23/1/2023.

173. Thandra KC, Barsouk A, Saginala K, et al. Epidemiology of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Med Sci.* 2021;9(1):5.

174. Römer K, Pfreundschuh M. How do estrogens control lymphoma? *Blood.* 2014;123(13):1980-1.

175. Talaber G, Yakimchuk K, Guan J, et al. Inhibition of estrogen biosynthesis enhances lymphoma growth in mice. *Oncotarget.* 2016;7(15):20718-27.

176. Morton LM, Wang SS, Richesson DA, et al. Reproductive factors, exogenous hormone use and risk of lymphoid neoplasms among women in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study Cohort. *Int J Cancer.* 2009;124(11):2737-2743.

177. Ser-cancer-gov [homepage on the Internet].The Surveillance, Epidemiology, and End Results Program Cancer Stat Facts: Non-Hodgkin Lymphoma. National Cancer Institute. [cited 2022 Septembar 8]. Available from <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/nhl.html>

178. Mallappallil M, Friedman EA, Delano BG, et al. Chronic kidney disease in the elderly: evaluation and management. *Clin Pract (Lond).* 2014;11(5):525-35.

179. Kim IH, Kisseleva T, Brenner DA. Aging and liver disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2015;31(3):184-191.

180. White MC, Holman DM, Goodman RA, et al. Cancer Risk Among Older Adults: Time for Cancer Prevention to Go Silver. *Gerontologist.* 2019;59(Suppl 1):S1-S6.

181. Kanda J, Matsuo K, Inoue M, et al. Association of anthropometric characteristics with the risk of malignant lymphoma and plasma cell myeloma in a Japanese population: a population-based cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(6):1623-31.

182. Jiménez-Cortegana C, Hontecillas-Prieto L, García-Domínguez DJ, et al. Obesity and Risk for Lymphoma: Possible Role of Leptin. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(24):15530.

183. Larsson SC, Wolk A. Obesity and risk of non-Hodgkin's lymphoma: a meta-analysis. *Int J Cancer.* 2007;121(7):1564-70.

184. Wierda WG, Zelenetz AD, Gordon LI, et al. NCCN Guidelines Insights: Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma, Version 1.2017. *J Natl Compr Canc*

Netw. 2017;15(3):293-311.

185. Hernandez-Ruiz E, Alvarado-Ibarra M, Juan Lien-Chang LE, et al. Epidemiology and Clinical Characteristics of Non-Hodgkin Lymphoma in Mexico. *World J Oncol.* 2021;12(1):28-33.

186. Sharma R, Cunningham D, Smith P, et al. Inflammatory (B) symptoms are independent predictors of myelosuppression from chemotherapy in Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) patients--analysis of data from a British National Lymphoma Investigation phase III trial comparing CHOP to PMitCEBO. *BMC Cancer.* 2009;9:153.

187. Hohloch K, Windemuth-Kieselbach C, Zinzani PL, et al. Radioimmunotherapy for mantle cell lymphoma: 5-year follow-up of 90 patients from the international RIT registry. *Ann Hematol.* 2020;99:1073-9.

188. Sharman JP, Melear JM, Yacoub A, et al. Induction R<sup>2</sup> followed by maintenance in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma: interim analysis from the phase 3b magnify study. *Hem Onco.* 2021;46: 73.

189. Başcı S, Yiğenoğlu TN, Bakırtaş M, et al. The effect of bulky mass on prognosis in diffuse large-B-cell lymphoma: still poor?. *Leuk Res.* 2021;102:106521.

190. El-Galaly TC, Villa D, Alzahrani M, et al. Outcome prediction by extranodal involvement, IPI, R-IPI, and NCCN-IPI in the PET/CT and rituximab era: A Danish-Canadian study of 443 patients with diffuse-large B-cell lymphoma. *Am J Hematol.* 2015;90(11):1041-6.

191. Das J, Ray S, Sen S et al. Extranodal involvement in lymphoma - A Pictorial Essay and Retrospective Analysis of 281 PET/CT studies. *Asia Ocean J Nucl Med Biol.* 2014;2(1):42-56.

192. Vannata B, Zucca E. Primary extranodal B-cell lymphoma: current concepts and treatment strategies. *Chin Clin Oncol.* 2015;4(1):10.

193. Kashyap R, Rai Mittal B, Manohar K, et al. Extranodal manifestations of lymphoma on [<sup>18</sup>F]FDG-PET/CT: a pictorial essay. *Cancer Imaging.* 2011;11(1):166-74.

194. Krol AD, le Cessie S, Snijder S, et al. Primary extranodal non-Hodgkin's lymphoma (NHL): the impact of alternative definitions tested in the Comprehensive Cancer Centre West population-based NHL registry. *Ann Oncol.* 2003; 14(1):131-9.

195. Broderick JM, Hussey J, Kennedy MJ, et al. Patients over 65 years are assigned lower ECOG PS scores than younger patients, although objectively measured physical activity is no different. *J Geriatr Oncol.* 2014;5(1):49-56.

196. Wästerlid T, Mohammad M, Smedby KE, et al. Impact of comorbidity on disease characteristics, treatment intent and outcome in diffuse large B-cell lymphoma - a Swedish lymphoma register study. *J Intern Med.* 2019;285(4):455-68.
197. Terret C, Albrand G, Rainfray M, Soubeyran P. Impact of comorbidities on the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: a systematic review. *Expert Rev Hematol.* 2015;8(3):329-41.
198. Roy S, Vallepu S, Barrios C, et al. Comparison of Comorbid Conditions Between Cancer Survivors and Age-Matched Patients Without Cancer. *J Clin Med Res.* 2018;10(12):911-9.
199. Numata A, Tomita N, Fujimaki K, et al. Retrospective study of the utility of FLIPI/FLIPI-2 for follicular lymphoma patients treated with R-CHOP. *J Clin Exp Hematop.* 2012;52(1):77-79.
200. Kim HD, Cho H, Jeong H, et al. A prognostic index for extranodal marginal-zone lymphoma based on the mucosa-associated lymphoid tissue International Prognostic Index and serum  $\beta$ 2-microglobulin levels. *Br. J. Haematol.* 2021;193:307-15.
201. Huang LW, Sun D, Link TM, et al. High incidence of fractures after R-CHOP-like chemotherapy for aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Support Care Cancer.* 2021;29(9):5399-408.
202. Svendsen P, Shekhrjka N, Nielsen KL, et al. R-CHOP(-like) treatment of diffuse large B-cell lymphoma significantly reduces CT-assessed vertebral bone density: a single center study of 111 patients. *Leuk Lymphoma.* 2017;58(5):1105-13.
203. Kuhn JG. Chemotherapy-associated hematopoietic toxicity. *Am J Health Syst Pharm.* 2002;59(15 Suppl 4):S4-S7.
204. Bairey O, Shacham-Abulafia A, Shpilberg O, et al. Serum albumin level at diagnosis of diffuse large B-cell lymphoma: an important simple prognostic factor. *Hematol Oncol.* 2016;34(4):184-192.
205. Khan MN, Khan AA. Cancer treatment-related bone loss: a review and synthesis of the literature. *Curr Oncol.* 2008;15(1):S30-S40
206. Chung PL, Zhou S, Eslami B, et al. Effect of age on regulation of human osteoclast differentiation. *J Cell Biochem.* 2014;115(8):1412-9.
207. Valentini A, Cianfarani MA, Tarantino U, et al. Osteoprotegerin as a biomarker of geriatric frailty syndrome. *Aging (Albany NY).* 2019;11(14):4900-9.
208. Bergantini L, d'Alessandro M, Cameli P, et al. Effects of rituximab therapy on B cell differentiation and depletion. *Clin Rheumatol.* 2020;39(5):1415-21.
209. Geusens P. The role of RANK ligand/osteoprotegerin in rheumatoid arthritis. *Ther Adv*



Musculoskelet Dis. 2012;4(4):225-33.

210. Jura-Póltorak A, Szeremeta A, Olczyk K, et al. Bone Metabolism and RANKL/OPG Ratio in Rheumatoid Arthritis Women Treated with TNF- $\alpha$  Inhibitors. *J Clin Med*. 2021;10(13):2905.

211. Boumans MJ, Thurlings RM, Yeo L, et al. Rituximab abrogates joint destruction in rheumatoid arthritis by inhibiting osteoclastogenesis. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(1):108-13.

212. Andreev D, Kachler K, Schett G, et al. Rheumatoid arthritis and osteoimmunology: The adverse impact of a deregulated immune system on bone metabolism. *Bone*. 2022;162:116468.

213. Pál I, Szamosi S, Hodosi K, et al. Effect of Fc $\gamma$ -receptor 3a (FCGR3A) gene polymorphisms on rituximab therapy in Hungarian patients with rheumatoid arthritis. *RMD Open*. 2017;3(2):e000485.

214. Chen P, Chen Xu R, Chen N, et al. Detection of Metastatic Tumor Cells in the Bone Marrow Aspirate Smears by Artificial Intelligence (AI)-Based *Morphogo* System. *Front Oncol*. 2021;11:742395.

215. Hu L, Yin C, Zhao F, Ali A, Ma J, Qian A. Mesenchymal Stem Cells: Cell Fate Decision to Osteoblast or Adipocyte and Application in Osteoporosis Treatment. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):360.

216. Wheeler G, Hogan VE, Teng YK, et al. Suppression of bone turnover by B-cell depletion in patients with rheumatoid arthritis. *Osteoporos Int*. 2011;22(12):3067-3072.

217. Westin J, Thompson M, Cataldo V, et al. Bone Loss in Lymphoma Patients Prior to Receiving Front-line Therapy. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*. 2010;10(3):132.

218. Alswat KA. Gender Disparities in Osteoporosis. *J Clin Med Res*. 2017;9(5):382-7.

219. Yaprak G, Gemici C, Temizkan S, et al. Osteoporosis development and vertebral fractures after abdominal irradiation in patients with gastric cancer. *BMC Cancer*. 2018; 18:972.

220. Ha J, Baek KH. Body mass index at the crossroads of osteoporosis and type 2 diabetes. *Korean J Intern Med*. 2020;35(6):1333-5.

221. Zhou L, Kuai F, Shi Q, et al. Doxorubicin restrains osteogenesis and promotes osteoclastogenesis in vitro. *American Journal of Translational Research*. 2020;12(9):5640-54.

222. Koh AJ, Sinder BP, Entezami P, et al. The skeletal impact of the chemotherapeutic agent etoposide. *Osteoporos Int*. 2017;28(8):2321-33.

223. De Martinis M, Allegra A, Sirufo MM, et al. Vitamin D Deficiency, Osteoporosis and

Effect on Autoimmune Diseases and Hematopoiesis: A Review. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16):8855.

224. Avnet S, Longhi A, Salerno M, et al. Increased osteoclast activity is associated with aggressiveness of osteosarcoma. *Int J Oncol*. 2008;33(6):1231-8.

225. Mansour, A., Aboerad, M., Qorbani, M. et al. Association between low bone mass and the serum RANKL and OPG in patients with nephrolithiasis. *BMC Nephrol* 2018;19:172.

226. Coiffier B, Sarkozy C. Diffuse large B-cell lymphoma: R-CHOP failure-what to do?. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016;(1):366-78.

227. Czuczman MS, Grillo-López AJ, White CA, et al. Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol*. 1999;17(1):268-76.

228. Abu Sabaa A, Mörth C, Hasselblom S, et al. Age is the most important predictor of survival in diffuse large B-cell lymphoma patients achieving event-free survival at 24 months: a Swedish population-based study. *Br J Haematol*. 2021;193(5):906-14.

229. Zhou Z, Sehn L, Rademaker A, et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood*; 2014;123(6):837-42.

230. Ruppert AS, Dixon JG, Salles G, et al. International prognostic indices in diffuse large B-cell lymphoma: a comparison of IPI, R-IPI, and NCCN-IPI. *Blood*. 2020;135(23):2041-8.

231. Casulo C. Risk stratification in follicular lymphoma. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 2018;31(1):15-22.

232. Kimby E, Lockmer S, Holte H, et al. The simplified follicular lymphoma PRIMA-prognostic index is useful in patients with first-line chemo-free rituximab-based therapy. *Br J Haematol*. 2020;191(5):738-47.

233. William BM, Bongu NR, Bast M, et al. The utility of lactate dehydrogenase in the follow up of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2013;35(3):189-91.

234. Tomita N, Kodama F, Sakai R, et al. Predictive factors for central nervous system involvement in non-Hodgkin's lymphoma: significance of very high serum LDH concentrations. *Leuk Lymphoma*. 2000;38(3-4):335-43.

235. García R, Hernández JM, Caballero MD, et al. Serum lactate dehydrogenase level as a prognostic factor in Hodgkin's disease. *Br J Cancer*. 1993;68(6):1227-31.

236. Zhang XZ, Su AL, Hu MQ, et al. Elevated serum ferritin levels in patients with

- hematologic malignancies. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(15):6099-101.
237. Shen Z, Zhang S, Zhang M, et al. The Addition of Ferritin Enhanced the Prognostic Value of International Prognostic Index in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Front Oncol.* 2022;11:823079.
238. Rico H, Ripoll E, Revilla M, et al. Beta 2-microglobulin in postmenopausal osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 1993;53(2):78-80.
239. Mena C, Esser E, Sprague SM. Beta2-microglobulin stimulates osteoclast formation. *Kidney Int.* 2008;73(11):1275-81.
240. Mohamed A. Serum  $\beta$ -CrossLaps as a predictor for osteoporosis in postmenopausal women with early diabetic nephropathy. *Egypt J Intern Med.* 2019;31:52-6.
241. Ahn H, Lee K, Kim JM, et al. Accelerated Lactate Dehydrogenase Activity Potentiates Osteoclastogenesis via NFATc1 Signaling. *PLoS One.* 2016;11(4):e0153886.
242. Mandal CC. High Cholesterol Deteriorates Bone Health: New Insights into Molecular Mechanisms. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015;6:165.
243. Zhou Y, Deng T, Zhang H, et al. Hypercholesterolaemia increases the risk of high-turnover osteoporosis in men. *Molecular Medicine Reports* 2019;19(6):4603-12.
244. Anagnostis P, Florentin M, Livadas S et al. Bone Health in Patients with Dyslipidemias: An Underestimated Aspect. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23:1639.
245. Lips P, van Schoor NM. The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(4):585-91.
246. Graklanov V, Popov V. Vitamin D levels in patients with non-Hodgkin lymphoma/diffuse large B-cell lymphoma, chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma. *J Int Med Res.* 2020;48(7):300060520943421.
247. Briot K, Roux C. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *RMD Open.* 2015;1(1):e000014. Published 2015 Apr 8. doi:10.1136/rmdopen-2014-000014.
248. Kobza AO, Herman D, Papaioannou A, Lau AN, Adachi JD. Understanding and Managing Corticosteroid-Induced Osteoporosis. *Open Access Rheumatol.* 2021;13:177-190

## IX PRILOZI

### Prilog 1. Prognozni indeksi

- **IPI**

Na osnovu broja prisutnih negativnih prognostičkih faktora (životna dob  $\geq 60$  godina, klinički stadijum III ili IV, povišena LDH-a, ECOG PS  $\geq 2$ , više od jedne ektranodalne lokalizacije), u vreme postavljanja dijagnoze, identifikovane su četiri prognozne grupe, na osnovu kojih se prognozira 5-godišnje preživljavanje.

Broj bodova	Prognoza (rizik)	5-godišnje preživljavanje
0-1	nizak rizik	73%
2	nizak/srednji rizik	51%
3	srednji/visok rizik	43%
4-5	visok rizik	26%

- **rIPI**

rIPI skor stratifikuje bolesnike u 3 prognozne grupe: grupa loše, dobre i vrlo dobre prognoze. U odnosu na IPI skor, rIPI skor smatra ECOG PS  $\geq 3$  faktorom rizika i prognozira 4-godišnje preživljavanje.

Broj bodova	Prognoza	4-godišnje preživljavanje
0	Veoma dobra	94%
1-2	Dobra	80%
3-5	Loša	53%

- **NCCN IPI**

NCCN IPI skor stratifikuje bolesnike u 4 prognozne grupe, uzimajući u obzir starost bolesnika, vrednost LDH, ECOG, prisustvo ektranodalne bolesti i klinički stadijum.

<b>Godine</b>	
> 40–≤ 60	1
> 60–≤ 75	2
> 75	3
<b>LDH (LDH)</b>	
> 1 – ≤ 3	1
> 3	2
<b>Ann Arbor stage III-IV/Ann Arbor stadijum III-IV</b>	1
<b>Extranodal disease/Ekstranodalna bolest</b>	1
<b>Performance status ≥ 2/Opšte stanje ≥ 2</b>	1

Grupe rizika prema vrednosti NCCN IPI indeksu

Broj bodova	Prognoza (rizik)	5-godišnje preživljavanje
0-1	nizak rizik	96%
2-3	nizak/srednji rizik	82%
4-5	srednji/visok rizik	64%
≥6	visok rizik	33%

- **FLIPI**

Parametri koji se vrednuju u okviru FLIPI indeksa, koji bolesnike stratifikuje u tri prognozne grupe, su: životna dob bolesnika, agresivnost tumora, odnosno vrednost LDH, broj zahvaćenih nodalnih područja, Ann Arbor klinički stadijum, uticaj tumora na koštanu srž, odnosno vrednost hemoglobina.

Životna dob	< 60 godina	60 godina i stariji
<b>LDH</b>	Normalna	Povišena
<b>Broj zahvaćenih nodalnih područja</b>	4 i manje	5 i više
<b>Ann Arbor stadijum</b>	I/II	III/IV
<b>Hemoglobin (g/l)</b>	120 i veći	< 120

Grupe rizika prema vrednosti FLIPI indeksa

Broj bodova	Rizik	5-godišnji OS
0-1	Nizak	71%
2	Srednji	51%
3-5	Visok	36%

- **FLIPI 2**

Ovaj prognozni indeks na osnovu starosti bolesnika iznad 60 godina, povišenog beta 2 mikroglobulina, vrednosti hemoglobin ispod 120g/l, infiltracije koštane srži i postojanja limfnog čvora većeg od 6 cm, stratifikuje bolesnike u tri prognodne grupe.

**Tabela 7. Grupe rizika prema vrednosti FLIPI-2 indeksa**

Broj bodova	Prognoza (rizik)	5-godišnje preživljavanje
0	nizak rizik	76%
1-2	srednji rizik	49%
3-5	visok rizik	37%

- **PRIMA PI**

U okviru ovog indeksa vrednuju se dva parametra: beta 2 mikroglobulin i infiltracija koštane srži.

Parametri	Rizik	5-godišnje preživljavanje
$\beta 2m > 3mg / L$	Visok rizik	39%
$\beta 2m \leq 3 mg$ sa infiltracijom KS	Srednji rizik	59%
$\beta 2m \leq 3 mg$ bez infiltracije KS	Nizak rizik	74%

- **MALT-IPI**

Indeks vrednuje tri klinička parametra ( $\geq 70$  godina života, Ann Arborov III/IV klinički stadijum i povišena vrednost serumske laktat dehidrogenaze) i stratifikuje bolesnike u tri grupe.

Grupe rizika prema vrednosti MALT IPI indeksa

MALT IPI skor	Rizik	5-godišnji EFS
0	Nizak	70%
1	Srednji	56%
2-3	Visok	29%

- **MIPI**

MIPI indeks omogućava stratifikaciju bolesnika na osnovu pet faktora rizika u tri prognozne grupe: grupe niskog (0-3 boda), srednjeg (4-5bodova) i visokog rizika (6-11 bodova).

Broj bodova	Životna dob	ECOG PS	LDH/ULN	Lkci (x10 <sup>9</sup> /l)
0	<50	0-1	<0.67	<6.7
1	50-59	-	0.67-0.99	6.7-9.99
2	60-69	2-4	1.00-1.49	10.000-14.99
3	≥70	-	≥1.5	≥15.00

- **MIPI-c**

Prema ovom indeksu bolesnici se mogu svrstati u četiri prognostičke grupe u zavisnosti od MIPI grupe i vrednosti Ki-67 indeksa.

MIPI-c grupa rizika	MIPI grupa	Ki-67 index
Nizak (0)	Nizak (0)	<30% (0)
Intermedijarni (1)	Nizak (0)	≥30% (1)
	Intermedijarni (1)	<30% (0)
Intermedijarni (2)	Intermedijarni (1)	≥30% (1)
	Visok (2)	<30% (0)
Visok (3)	Visok (2)	≥30% (1)

- **ISSWM**

Ovaj indeks na osnovu životne dobi bolesnika, koncentracije hemoglobina, broja trombocita, serumske koncentracije β2 mikroglobulina i monoklonskog proteina, bolesnike svrstava u tri grupe: grupu niskog, srednjeg i visokog rizika.

Životna dob	≤ 65 godina *	>65 godina
Hemoglobin (g/l)	115 i veći	< 115
Trombociti (x10 <sup>9</sup> /l)	≤ 100	>100
β2-mikroglobulin (mg/l)	> 3	< 3
monoklonski protein (g/l)	> 70	< 70

<b>Broj bodova</b>	<b>Rizik</b>	<b>Medijana preživljavanja (meseci)</b>
0-1	Nizak	142
2	Srednji	99
$\geq 3$	Visok	43



## Prilog 2. Referentne vrednosti pojedinih laboratorijskih parametara

	Referentne vrednosti
<b>Ukupni Ca</b>	2,20-2,70 mmol/l
<b>Jonizovani Ca</b>	0,95-1,30 mmol/l
<b>Fosfor</b>	0,80-1,45 mmol/l
<b>Magnezijum</b>	0,66-1,07 mmol/l
<b>Alkalna fosfataza</b>	35-104 U/l
<b>Vitamin D</b>	35-120 nmol/l
<b>P1NP</b>	Generativni perido. 15,1-58,6 ng/ml Postmenop. 16,3-73,9 ng/ml
<b>Beta Crosslaps</b>	Generativni period 299-573 pg/ml Postmenop. 556-1008 pg/ml

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

## План третмана података

<b>Назив пројекта/истраживања</b>
<b>„УТИЦАЈ АНТИ-ЦД20 МОНОКЛОНСКОГ АНТИТЕЛА НА КОШТАНЕ БИОХЕМИЈСКЕ МАРКЕРЕ И РАНКЛ/ОПГ СИСТЕМ КОД НОВОДИЈАГНОСТИКОВАНИХ БОЛЕСНИКА СА Б - ЋЕЛИЈСКИМ НЕХОЧКИНСКИМ ЛИМФОМИМА”</b>
<b>Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање</b>
<b>а) Клиника за хематологију б) Клиника за ендокринологију, дијабетес и болести метаболизма</b>
<b>Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање</b>
<b>Докторске академске студије, смер клиничка медицина</b>
<b>1. Опис података</b>
<p>1.1 Врста студије Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</p> <p><b>Проспективно истраживање у оквиру докторске дисертације је спроведено на укупно 60 испитаника оболелих од Б ћелијског нехочкинског лимфома. Праћени су лабораторијски маркери коштаног метаболизма, РАНКЛ и остеопротегерин, коштана густина, пре и после терапије. Вршена је корелација горе наведених маркера код испитаника који су примали у оквиру свог лечења анти-ЦД20 антитело уз стандардне хемиотерапијске протоколе и код оних који су лечени стандардним хемиотерапијским протоколима.</b></p> <p>1.2 Врсте података а) квантитативни б) квалитативни</p> <p>1.3. Начин прикупљања података а) анкете, упитници, тестови / б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи в) генотипови: навести врсту / г) административни подаци: навести врсту / д) узорци ткива: крв и замрзнути крвни серум ђ) снимци, фотографије: снимци урађених радиолошких прегледа, остеодезитометријских прегледа е) текст: литература ж) мапа, навести врсту / з) остало: описати /</p> <p>1.3 Формат података, употребљене скале, количина података <b>Формат података: табеларан, графикони</b></p>

**Количина унетих података: више од 5000**

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

- a) Excel фајл, датотека . *xlsx*
- b) SPSS фајл, IBM SPSS Statistics, Version 26.0, конвертован у csv. формат**
- c) PDF фајл, датотека .*pdf*
- d) Текст фајл, датотека .*docx*
- e) JPG фајл, датотека .*jpg*
- f) Остало, датотека /

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- a) број варијабли: **преко 50**
- b) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) **60 испитаника**

1.3.3. Поновљена мерења

**a) да**

b) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- a) временски размак између поновљених мера је **6 месеци**
- b) варијабле које се више пута мере односе се на: **процену стања основне болести, на коштани метаболизам и коштану густину**
- v) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као: **испитивана група.xlsx sheet 2, испитивана група.xlsx sheet 3, контролна група.xlsx sheet 2, контролна група.xlsx sheet 3**

Напомене: /

*Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?*

**a) Да**

b) Не

*Ако је одговор не, образложити /*

## 2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

- a) експеримент, навести тип /
- b) корелационо истраживање, навести тип: проспективно истраживање**
- ц) анализа текста, рикупљање података из литературе и на основу њих постављање хипотеза, а потом у дискусији анализа добијених резултата и поређење с резултатима истраживања других**
- d) остало, навести шта /

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје). /

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

- a) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- a) Колики је број недостајућих података?
- b) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да **Не**

в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

*Квалитет лабораторијских резултата је контролисан у складу са стандардима добре лабораторијске праксе и по стандардној лабораторијској процедури валидације добијених резултата. Квалитет података је контролисан применом статистичких тестова и валидацијом података*

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

*Контрола уноса података је контролисана вишеструким личним проверавањима и независним проверавањима од стране сарадника и ментора те поређењем с похрањеним подацима у медицинској документацији*

### 3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијуму докторских дисертација Универзитета у Новом Саду.

3.1.2. URL адреса <https://cris.uns.ac.rs/searchDissertations.jsf>

3.1.3. DOI \_\_\_\_\_

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) **Да, са сваком појединачном публикацијом**

б) **Да, али после ембарга који ће трајати до**

в) **Не**

Ако је одговор не, навести разлог \_\_\_\_\_

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење /

3.2. Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? /

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум. /

*Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд. /*

3.3. Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? **Трајно**

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да **Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена? Да **Не**

Образложити /

### 4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1. Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности ([https://www.paragraf.rs/propisi/zakon\\_o\\_zastiti\\_podataka\\_o\\_licnosti.html](https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html)) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? **Да Не**  
Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање  
**Етички одбор Медицинског Факултета Универзитета у Новом Саду 10.3.2016.**

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да **Не**  
Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
- б) Подаци су анонимизирани
- ц) Остало, навести шта

## 5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

- а) јавно доступни, након објављивања појединачних публикација
- б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области
- ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе: /

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима: /

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

**Ауторство-некомерцијално-без прераде. Дозвољава се умножавање, дистрибуција и јавно саопштавање дела, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.**

## 6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

**Марина Драгичевић Јојкић**  
**email: [marina.dragicevic@mf.uns.ac.rs](mailto:marina.dragicevic@mf.uns.ac.rs)**

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

**Марина Драгичевић Јојкић**  
**email: [marina.dragicevic@mf.uns.ac.rs](mailto:marina.dragicevic@mf.uns.ac.rs)**

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

**Марина Драгичевић Јојкић**  
**email: [marina.dragicevic@mf.uns.ac.rs](mailto:marina.dragicevic@mf.uns.ac.rs)**